

А.В. Гутнов¹, О.В. Белов², Г.С. Качмазов¹, Т.Т. Магкоев¹, Н.Р. Попова³, Н.Е. Пухаева^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ НА МЕТАБОЛИЗМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИ И БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

¹ Северо-Осетинский государственный университет, Владикавказ

² Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Контактное лицо: А.В. Гутнов, e-mail: gutnov@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Провести обзор литературных данных по применению технологии тяжелоионного лучевого мутагенеза для селекции различных микроорганизмов, таких как бактерии, мицелиальные грибы, дрожжи и микроводоросли для биотехнологического применения.

Материал и методы: Собраны данные за последние 15 лет по метаболическим эффектам у мутантов, полученных облучением тяжелыми ионами, биотехнологически значимых микробиологических объектов (бактерии, грибы, водоросли).

Результаты: Обсуждаются биотехнологическая значимость, а также генетические, морфологические и прочие аспекты обнаруженных изменений мутантных микробиологических объектов. В настоящее время мутагенез, индуцированный тяжелоионным облучением с высокой линейной передачей энергии и высокой биологической эффективностью, признан в качестве нового мощного метода для создания микробных штаммов с ранее не известными свойствами. Мы полагаем, что направленная селекция с помощью тяжелоионного мутагенеза внесет большой прогрессивный вклад в моделирование промышленных штаммов-продуцентов для биотехнологии.

Заключение: Исследования, описанные в данном обзоре, позволяют предположить, что применение ионно-лучевой мутагенной технологии для микроорганизмов полезно как для фундаментальной науки, так и для прикладных исследований.

Ключевые слова: биотехнология, микроорганизмы, метаболизм, мутагенез, облучение тяжелыми ионами

Для цитирования: Гутнов А.В., Белов О.В., Качмазов Г.С., Магкоев Т.Т., Попова Н.Р., Пухаева Н.Е. Влияние облучения тяжелыми ионами на метаболизм технологически и биологически значимых микроорганизмов: биотехнологические перспективы применения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 1. С. 21–29. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-21-29

DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-21-29

A.V. Gutnov¹, O.V. Belov², G.S. Kachmazov¹, T.T. Magkoev¹, N.R. Popova³, N.E. Pukhaeva^{1,2}

The Effect of Heavy Ion Irradiation on the Metabolism of Technologically and Biologically Significant Microorganisms: Biotechnological Prospects of Application

¹ North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia

² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia

Contact person: A.V. Gutnov, e-mail: gutnov@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To review the literature on the use of heavy ion beam mutagenesis for selecting various microorganisms, including bacteria, fungi, yeast, and microalgae, for biotechnological purposes.

Material and methods: Data have been collected over the past 15 years on the metabolic effects of mutants exposed to heavy ions, biotechnologically significant microbiological objects (bacteria, fungi, algae).

Results and discussion: The biotechnological and genetic significance, as well as the morphological and other aspects of the detected changes in mutant microbiological objects, are discussed. Currently, heavy ion irradiation-induced mutagenesis with high linear energy transfer and biological efficiency is recognized as a powerful new method for creating microbial strains with previously unknown properties. We believe that targeted breeding using heavy ion mutagenesis will make a significant contribution to the development of industrial producer strains for biotechnology.

Conclusion: The studies discussed in this review indicate that the use of ion beam mutagenesis for microorganisms can be beneficial for both fundamental science and applied research.

Keywords: biotechnology, microorganisms, metabolism, mutagenesis, heavy ion irradiation

For citation: Gutnov AV, Belov OV, Kachmazov GS, Magkoev TT, Popova NR, Pukhaeva NE. The Effect of Heavy Ion Irradiation on the Metabolism of Technologically and Biologically Significant Microorganisms: Biotechnological Prospects of Application. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(1):21–29. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-21-29

Введение

Техническое улучшение микроорганизмов может быть достигнуто с помощью двух основных подходов: рациональная генная инженерия и случайный мутагенез с последующим метаболическим и молекулярно-генетическим скринингом [1]. По мере накопления знаний о механизме регуляции метаболизма микроорганизмов рациональный дизайн и последующая метаболическая инженерия постепенно становятся все более важным инструментом для создания улучшенных мутантных штаммов. Тем не менее, и по сей день большинство штаммов технологически значимых микроорганизмов создаются случайным мутагенезом с последующей селекцией хитов, так как рациональная генно-метаболическая инженерия остается затруднительной, в основном из-за плохого понимания биохимических стадий и деталей регуляторных механизмов в микроорганизмах.

Мутационная селекция микроорганизмов путем изменения геномов позволяет получить стабильные микробные мутанты с желаемым фенотипом, и этот подход широко применяется в биотехнологии [2]. В природе мутации возникают путем естественного эволюционного отбора, но этот процесс в микробной популяции требует неопределенно много времени из-за низкой частоты спонтанных мутаций, что не позволяет ему стать практическим в технике осуществления направленной эволюции. Поэтому до сих пор изучались и применялись многие методы искусственного мутагенеза, направленные на повышение скорости мутаций, в основном с использованием химических или физических мутагенов. Ионизирующее излучение, включающее ионы водорода, гелия, углерода и более тяжелых заряженных частиц, уже давно используется в качестве мутагена для селекции микроорганизмов и растений [3]. В частности, пучки тяжелых ионов, одна из форм ионизирующего излучения, использовались как эффективное средство для создания новых штаммов микроорганизмов и сортов растений. Все больше данных свидетельствует о том, что тяжелые ионные пучки позволяют получить более высокую скорость мутаций и более широкий мутационный спектр в живой клетке.

Замечательной физической характеристикой ускоренных тяжелых ионов с энергией порядка МэВ/мкм является возможность плотной фокусировки высокой энергии в локализованной области вдоль трека высокоэнергетических частиц. Поэтому пучки тяжелых ионов признаны мутагенами с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ – энергия, передаваемая на единицу длины, измеряемой в кэВ/мкм). Все больше экспериментальных исследований подтверждают, что значение ЛПЭ может быть критическим фактором, влияющим на биологическую эффективность тяжелоионного мутагенеза [4]. ЛПЭ традиционных методов мутагенеза, включая γ -фотоны, рентгеновское излучение и электронные пучки, составляет обычно 0,2 и 2,0–5,0 кэВ/мкм соответственно, в то время как ЛПЭ пучка тяжелых ионов может быть существенно выше. Поглощение энергии при мутагенном воздействии тяжелыми ионами эффективно вызывает двунитевые разрывы в молекулах ДНК, которые медленно восстанавливаются или вообще не поддаются восстановлению. Эти невосстановленные и/или ошибочно восстановленные повреждения ДНК, вызванные тяжелоионным мутагенезом, по сравнению с облучением низковольтным излучением, могут играть решающую роль в наблюдаемой более высокой биологической эффективности при гибели клеток, хромосомных aberrациях и мутагенезе в живом организме [5]. Такие значительные повреждения ДНК, индуцирован-

ные тяжелоионным воздействием, полезны для получения мутантов с новыми метаболическими свойствами. Поэтому мутагенез при облучении тяжелыми ионами с высокой энергией в комбинации с использованием высокоэффективных скрининговых аналитических систем представляется мощным инструментом в селекции технологически значимых микроорганизмов и растений.

Бактерии

Клостриди и маслянокислое/бутанольное брожение

Микроорганизмы рода клостридий представляют собой грамположительную, палочковидную, спорообразующую, облигатно анаэробную бактерию [6]. Основными продуктами ферментации углеводного сырья клостридиями являются масляная кислота, н-бутанол, уксусная кислота, водород и углекислый газ, продуцируемые из различных углеводов, включая глюкозу, ксилозу, фруктозу, дисахариды, сахарозу и лактозу.

Биобутанол – биотопливо нового поколения, которое используется в качестве топлива благодаря низкому давлению паров, высокому содержанию энергии и технической схожести с бензином [7]. Масляная кислота также может быть биоконвертирована в н-бутанол под действием ферментации определенных штаммов бактерий или химически. Кроме того, биобутанол, как и другие виды биотоплива, имеет множество преимуществ, включая экономичность, возобновляемость, экологичность и углеродную нейтральность. Обычно масляная кислота производится путем оксосинтеза бутиральдегида из пропилена. Однако такой чисто химический синтез масляной кислоты не является экономически привлекательным и экологически устойчивым, поскольку сырье для него получают из ископаемого топлива.

Традиционная биотехнология маслянокислой ферментации углеводов клостридиями пока не является экономически полностью конкурентоспособной [8]. Например, выход масляной кислоты составляет всего 0,8–1,1 моль/моль из ферментированной глюкозы, пентозы, ксилозы и гексозы, а выход уксусной кислоты – всего 0,32–0,42 моль/моль. Поэтому улучшение штаммов этих бактерий путем мутагенеза и селекции играет центральную роль в коммерческом развитии этих процессов.

В исследовательском центре тяжелых ионов в Ланьчжоу было проведено облучение клеток различных штаммов *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 углеродными ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ при различных энергиях пучка [9]. Очень ограниченная выживаемость ($e^{-3.5} \rightarrow e^{-6.5}$) была получена при облучении $^{12}\text{C}^{6+}$ -ионами с энергией 114 МэВ/нуклон, дозой 20–40 Гр и 10^6 – 10^8 ион/импульсов. После облучения очень небольшой процент выживших особей мутантов *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 был исследован на способность к производству масляной кислоты.

Генерация масляной кислоты облученными штаммами была значительно улучшена как по концентрации конечного продукта, так и по выходу по сравнению со штаммом дикого типа. Тolerантность облученных штаммов к масляной кислоте была значительно повышена, что позволило им производить больше масляной кислоты, и, как следствие, привело к полной утилизации глюкозы и синтезу более 32 г/л масляной кислоты при сходном уровне клеточной биомассы. В целом, конечная концентрация масляной кислоты увеличилась на 68 % по сравнению со штаммами дикого типа. Генетические исследования не производились.

Та же группа провела исследование влияния облучения пучком ионов углерода на устойчивость к н-бутанолу и продуктивность штамма *Clostridium acetobutylicum* [10]. Как известно, н-бутанол обладает высокой токсичностью по отношению к бактериям-продуцентам, и его ингибирующие концентрации обычно не превышают нескольких грамм н-бутанола на литр ферментируемого раствора, что сильно сдерживает техническое использование этого перспективного биотехнологического процесса. В ходе исследования шесть образцов клеточной суспензии *Clostridium acetobutylicum* были облучены дозами 30, 60, 90, 120, 150 и 200 Гр. Испытания на мутагенез при облучении проводились с помощью пучков углеродных ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ с энергией 80 МэВ/нуклон. В биохимическом исследовании были проверены пять выживших мутантов. При этом мутант Y217 достиг уровня производства бутанола 13,67 г/л, превысив показатели штамма дикого типа ATCC 824 (9,77 г/л).

В другой работе [11] использовали *Clostridium beijerinckii* в качестве исходного штамма и объединили технологию облучения низкоэнергетическим пучком ионами азота, индукцию мутаций N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином и модель рационального отбора для модификации штамма; в итоге они получили мутант с отличными клеточными характеристиками и значительно увеличили производство бутанола. Выход бутанола из мутантного штамма достиг $15,8 \pm 0,7$ г/л, что в 1,46 раза превышало выход из исходного штамма.

Лактобациллы как продуценты молочной кислоты

Ферментация углеводов при температуре выше 50 °С с использованием термофильных бактерий, таких как *Lactobacillus thermophilus* [12], является наиболее важным процессом для промышленного получения L-молочной кислоты [13]. И хотя *Lactobacillus thermophilus* коммерчески очень привлекателен для этих целей, выход L-молочной кислоты и производительность штамма все еще нуждаются в дальнейшем улучшении, чтобы соответствовать коммерческим требованиям. Для этих целей была предложена мутационная селекция высокопродуктивного штамма *Lactobacillus thermophilus* с помощью случайного мутагенеза, полученного облучением тяжелыми ионами [14]. Исходный штамм *Lactobacillus thermophilus* SRZ50, способный продуцировать L-молочную кислоту, был суспендирован в облучательном реакторе и подвергнут мутагенезу ионами углерода 80 МэВ/нуклон с ЛПЭ 40 кэВ/мкм. Дозы облучения были установлены как 75 и 100 Гр. Колонии, демонстрирующие крупные желтые ореолы на питательной среде, были собраны в качестве первичного отбора, а затем культивированы для накопления L-молочной кислоты. На основе этого скрининга были отобраны два мутанта с высокой продуктивностью L-молочной кислоты, A59 и A69, которые показали, соответственно, на 15,8 % и 16,2 % более высокую продуктивность, чем исходный штамм. Особенно мутант A69 с самым высоким выходом молочной кислоты, который может накапливать 114,2 г/л L-молочной кислоты в течение 96 ч при ферментации в реакторе.

Стрептомицеты и биосинтез авермектина

Авермектины [15] являются антибиотиками-метаболитами *Streptomyces avermitilis* [16]. Вторичные метаболиты этого вида вызывают большой интерес благодаря своей уникальной макроциклической структуре и широкой инсектицидной и антигельминтной активности (рис. 1) [17].

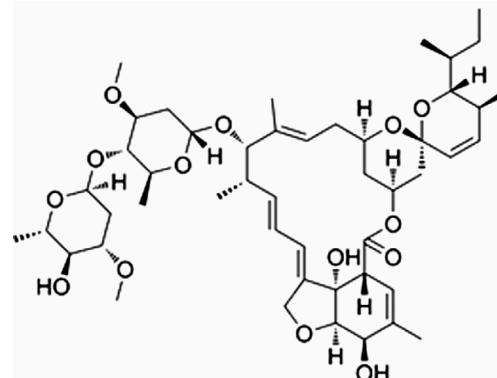


Рис. 1. Авермектин B1a

Fig. 1. Avermectin B1a

Значимость полученных мутаций, индуцированных облучением тяжелыми ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ для производства авермектина B1a инженерными *Streptomyces avermitilis*, была продемонстрирована в работе [18]. В данном исследовании изучалось влияние облучения тяжелыми ионами на *Streptomyces avermitilis* при культивировании в биореакторах с мешалкой объемом около 10 л. После воздействия большой дозы высокоЭнергетических тяжелых ионов выжившие особи могли представлять собой мутантов. Выживаемость 13,7, 8,4 и 3,4 % была определена после культивирования на среде в течение 6 сут при 28 °С. В общей сложности на 100 пластинах выросло более 1 тыс. одиночных колоний. Эти колонии явно отличались от тех, что развились из необлученных спор. Выжившие споры демонстрировали разнообразную текстуру и цвет колоний, например, плоскую соломинку, серый распаренный хлеб, белые лысые и тауповые пунцовье формы. Удельная продуктивность по авермектину B1a мутантом *Streptomyces avermitilis* 147-G58 значительно увеличилась по сравнению с исходным штаммом – с 3885 до 5446 мкг/мл, то есть примерно в 1,6 раза. Результаты показали, что доза облучения тяжелыми ионами, соответствующая оптимальному производству, составляет примерно 80 Гр при 220 МэВ/нуклон.

Стрептомицеты как продуценты эндурацидина

Эндурацидин (энрамицин), продуцируемый *Streptomyces fungicidicus* [19], является одним из основных коммерческих противопаразитарных препаратов, широко используемых в сельском хозяйстве, животноводстве и здравоохранении благодаря своей высокой безопасности, низкой токсичности, маловероятности возникновения лекарственной устойчивости, мощному бактерицидному действию на большинство грамположительных бактерий и способности стимулировать рост животных [20]. В природе *Streptomyces fungicidicus* может накапливать только низкую концентрацию эндурацидина, поэтому необходимы дальнейшие биотехнологические разработки для увеличения производства эндурацидина этим штаммом (рис. 2).

Для этого в работе [21] суспензию бактерий исходного штамма *Streptomyces fungicidicus* SG-01, способного продуцировать эндурацидин, в облучательной посуде подвергали мутагенезу ионами углерода 80 МэВ/нуклон с ЛПЭ 40 кэВ/мкм. Дозы облучения были установлены как 0, 20, 40, 60, 80 и 100 Гр. Выжившие мутанты были протестированы на способность подавлять рост *Bacillus subtilis*. Для повторного скрининга были отобраны исходный *Streptomyces fungicidicus* SG-01 и его мутанты с большой зоной ингибирования для ферментации в

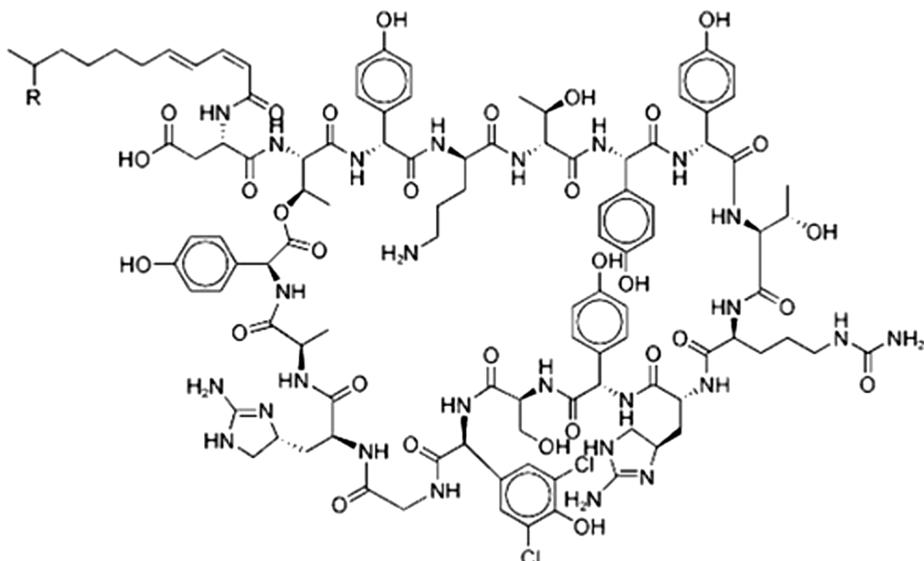


Рис. 2. Эндурацидин (энрамицин)
Fig. 2. Enduracidin (enramycin)

колбе. Всего первоначальный скрининг выявил 44 положительных мутанта с большей зоной ингибирования, которые впоследствии были протестираны на основе колбовой ферментации. В итоге 20 мутантов показали 20-процентное увеличение производства эндурацидина по сравнению с исходным штаммом. Среди них производство эндурацидина тремя мутантами (M13, M30 и M34) было значительно выше, чем у исходного штамма. В частности, мутант M30 продемонстрировал самую высокую продукцию эндурацидина, которая на 114 % превышала аналогичный показатель исходного штамма. После оптимизации культуры максимальный выход эндурацидина, полученный с помощью M30, достиг 918,5 мг/л за 10 сут, что на 34 % выше, чем в контроле.

Dietzia natronolimnaea как производитель кантаксантин

Dietzia natronolimnaea [22] – один из важнейших бактериальных биоресурсов для высокоэффективного производства кантаксантина [23], ценного пищевого красителя и антиоксиданта (пищевая добавка E161g). Поэтому в этой области постоянно ведутся работы с целью повышения продуктивности микроорганизма (рис. 3) [24].

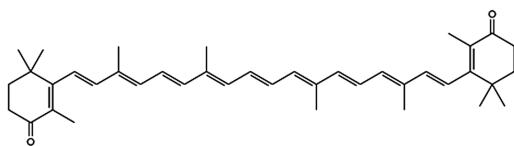


Рис. 3. Кантаксантин
Fig. 3. Cataxanthin

В работе [25] было обнаружено, что облучение штамма *Dietzia natronolimnaea* svgcc 1.2736 ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ в малолетальных дозах привело к увеличению производства кантаксантина и, следовательно, является эффективным методом улучшения штамма. Исходя из этих результатов, оптимальная доза – 0,5–4,5 Гр, ЛПЭ 80 кэВ/мкм и энергия 60 МэВ/нуклон для облучения ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ являются идеальными для оптимального и специфического производства кантаксантина в бактерии. Наибольший выход кантаксантина (8,14 мг) был полу-

чен на оптимизированной среде, содержащей 21,5 г/л D-глюкозы, 23,5 г/л маннозы и 25 ppm Mg^{2+} в 1 л при дозе облучения 4,5 Гр.

Мицелиальные грибы

Aspergillus как производители ловастатина

Ловастатин, являющийся метаболитом мицелиальных грибов, действует как конкурентный ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзима А (HMG-CoA) редуктазы, которая является лимитирующим ферментом биосинтеза холестерина (рис. 4) [26].

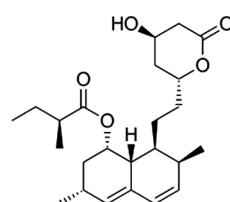


Рис. 4. Ловастатин
Fig. 4. Lovastatin

Он способен эффективно снижать уровень холестерина в плазме крови у различных видов млекопитающих, включая человека, и тем самым эффективен в терапии гиперхолестеринемии. Ловастатин может вырабатываться в качестве вторичного метаболита различными нитевидными грибами, включая *Penicillium sp.*, *Monascus ruber* и *Aspergillus terreus*. Для коммерческого производства ловастатина используется ферментация при помощи *Aspergillus terreus* [27], а повышение производительности этого штамма имеет важное значение для экономически оправданного процесса [28].

Для получения более продуктивных штаммов споры *Aspergillus terreus* CA99 были облучены в дозах 15, 20, 25 и 30 Гр пучками тяжелых ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ с энергией 80 МэВ/нуклон [29]. На основании содержания ловастатина в ферментационном бульоне был отобран штамм, обозначенный как *Aspergillus terreus* Z15-7. По сравнению с исходным штаммом, содержание ловастатина в ферментационном бульоне *Aspergillus terreus* Z15-7 уве-

личилось в 4 раза (с 171,2 до 689,1 мкг/мл). Результат показывает, что облучение тяжелым ионным пучком является эффективным методом мутационной селекции производства ловастатина у *Aspergillus terreus*.

Аспергиллы как продуценты лимонной кислоты

Ферментативное получение лимонной кислоты является одной из крупнейших биотехнологических отраслей, и считается, что *Aspergillus niger* является наиболее эффективным штаммом для производства лимонной кислоты путем ферментации углеводсодержащего сырья [30]. По разным оценкам, объем лимонной кислоты, получаемой путем ферментации, составляет $1,7 \times 10^6$ т/год, однако промышленные потребности в лимонной кислоте продолжают расти [31].

В работе [32] ряд мутантов, полученных облучением ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ были протестированы в плёночной среде. Было обнаружено, что по сравнению с родительскими штаммами производство лимонной кислоты скрининговыми штаммами H4002 и XHW3 значительно улучшилось с точки зрения конечной концентрации лимонной кислоты и производительности. Особенно для H4002, который показал самую высокую производительность в производстве лимонной кислоты с ее увеличением на 8,9 %.

Далее, для крупномасштабного промышленного производства лимонной кислоты был опробован мутант H4002 в 50-литровой биореакторной установке с хорошими техническими характеристиками, такими как способность поддержания высокого уровня растворенного кислорода. Результаты показали, что штаммом H4002 было накоплено 177,7–196,0 г/л лимонной кислоты при использовании дешевого гидролизата кукурузного шрота, содержащего исходные 200,0–235,7 г/л сахара, с производительностью 2,96–3,27 г/(л·ч). Также было обнаружено, что мутант H4002 может перерабатывать недорогую кукурузную муку в качестве сырья для эффективного производства лимонной кислоты. Эти результаты означают, что штамм H4002 обладает потенциалом высокоэффективного промышленного производства лимонной кислоты и составляет объективно высокую конкуренцию в крупнотоннажном производстве лимонной кислоты.

Аспергилла как продуцент целлюлазы

Похожее исследование было проведено также по целлюлолитической активности ферментов *Aspergillus niger* [33]. Среди целлюлолитических грибов *Aspergillus niger* в основном используется для производства внеклеточных целлюлаз, включая β -глюкозидазу и эндоглюканазу [34]. *Aspergillus niger* производит β -глюкозидазы высокой активности, которая вызывает дегликозилирование субстратов с получением гентиобиозы, сильного индуктора целлюлаз. Однако низкая активность целлюлазы сдерживает промышленное использование этих ферментов [35]. Необходимо найти эффективный метод повышения активности целлюлазы *Aspergillus niger* для ее коммерческого использования.

Споры облучали ионами $^{12}\text{C}^{6+}$ с энергией 80 МэВ/нуклон на установке по изучению тяжелых ионов в Ланьчжоу (Институт современной физики). Девять групп исходных штаммов *Aspergillus niger* H11 были подготовлены и облучены дозами 0, 40, 80, 100, 120, 140, 160, 200 и 250 Гр. Пучки ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ с энергией 80 МэВ/нуклон имели ЛПЭ 40 кэВ/мкм. Активность целлюлаз мутированных организмов, выращенных из облученных спор, была определена тестом с фильтровальной бумагой и скринингом ферментации цел-

люлазы на микролитровых пластинах. Семнадцать штаммов показали более высокую целлюлазную активность по сравнению с исходными штаммами. В частности, активность на фильтровальной бумаге и β -глюкозидазная активность мутанта *Aspergillus niger* H11201 увеличились на 38,74 и 63,23 % соответственно по сравнению с исходным *Aspergillus niger* H11.

Триходерма как продуцент целлюлазы

Trichoderma viride [36] – гриб, разлагающий целлюлозу, выделяет большое количество фермента целлюлазы. Соотношение β -глюкозидазы в его ферментном комплексе даже выше, чем в ферментной смеси из *Trichoderma reesei*. При этом производство целлюлолитических ферментов является ключевым фактором в гидролизе целлюлозного сырья и необходимо для того, чтобы сделать процесс экономически выгодным [37]. Эффективность индукции мутаций и отбора штаммов при использовании существующих методов остается низкой и неэффективной, требуя скрининга большой популяции для выявления реакционных мутантов, что является трудоемким и дорогостоящим.

Целью данного исследования [38] было получение высокого уровня внеклеточной целлюлазы у мутанта *Trichoderma viride*, полученного облучением электронным пучком и ионным пучком $^{12}\text{C}^{6+}$. Взвесь спор родительского штамма гриба облучали на ускорителе электронов в диапазоне доз от 100 до 1500 Гр. Затем споры отобранных мутантов облучали пучком $^{12}\text{C}^{6+}$ -ионов дозами 10–250 Гр; мощности доз для этих двух пучков были подобраны таким образом, чтобы составлять примерно 4 Гр/мин. Эффекты мутаций были исследованы путем определения мест мутации генов целлюлазы при помощи метода ПЦР.

Для оценки активности фермента, выделенного из выращенных спор мутантов, в качестве субстрата для теста на осахаривание были выбраны опилки. Целлюлазы, полученные из родительского и мутантного штаммов, оценивали по эффективности биоконверсии или осахаривания. Результат показал, что родительский штамм был значительно улучшен после комбинированного мутагенеза с использованием пучков электронов и $^{12}\text{C}^{6+}$ -ионов. Целлюлаза, полученная из мутанта *Trichoderma viride* CIT 626, в два раза лучше гидролизовала опилки (83 % конверсии), чем родительский штамм (42,5 % конверсии).

Дрожжи

Повышение липидной продуктивности олеогенных дрожжей *Rhodotorula glutinis*

Производство микробиальных масел с помощью олеогенных микроорганизмов [39], к которым относятся бактерии, дрожжи, плесени и водоросли, уже много лет является предметом как исследовательского, так и промышленного интереса. Микробиальные полиненасыщенные жирные кислоты, такие как докозагексаеновая кислота и арахидоновая кислота, очень важны в питании. Благодаря схожему с растительными маслами составу жирных кислот микробные масла в настоящее время являются потенциальным сырьем для производства биодизеля. Поэтому любое значительное увеличение выхода липидов из олеогенных штаммов открывает широкие возможности для промышленного производства.

В последнее время растет интерес к биотехнологическому применению красных олеогенных дрожжей *Rhodotorula glutinis* [40]. Этот гриб производит кароти-

ноиды (провитамины A), такие как бета-каротин и токуларгодин, которые животные не могут синтезировать самостоятельно. В дрожжах каротиноиды действуют как защитное средство от видимого света и вредных метаболических форм кислорода.

В следующей работе [41] экспоненциально растущие культуры дрожжей *Rhodotorula glutinis* AY 91015 облучали ионами углерода с энергией 80 МэВ/нуклон. Дозы облучения составляли 5, 15, 40 и 55 Гр, и были рассчитаны на основе плотности потока частиц и ЛПЭ. Выживаемость дрожжевых клеток после облучения определяли с помощью стандартного теста на образование колоний. После проведения ферментации концентрация липидов определялась с помощью сульфо-фосфо-ванилиновой реакции. Оценка концентрации липидов показала, что 22 колонии из 33 выделенных имеют повышенную концентрацию липидов по сравнению с контрольным образцом, т.е. уровень положительной селекции составил 66 %. Среди улучшенных 22 колоний мутант M5 с концентрацией липидов 0,60 г/л и M16 с концентрацией липидов 0,65 г/л были особенно выдающимися по сравнению с контролем с концентрацией липидов 0,34 г/л.

Повышение продуктивности спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Пять мутантов с высокой способностью к производству спирта были отобраны после облучения спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ионами углерода с энергией 100 МэВ/нуклон [42]. Эксперимент по ферментации сока сладкого сорго показал, что способность мутантного штамма T4 продуцировать спирт увеличилась на 18,6 % по сравнению с контрольным штаммом. Остаточное содержание сахара в соке также снизилось. После этого были исследованы оптимальные условия ферментации штамма T4 в соке сладкого сорго. Результаты показали, что оптимальная температура и значение pH для ферментации составляют 30 °C и 4,5 соответственно. Проверочный эксперимент проводился в 10-литровом биореакторе, и полученные данные показали, что скорость ферментации и способность производить алкоголь у штамма T4 выше, чем у контрольного штамма при тех же условиях ферmentationи.

Производование сквалена дрожжами *Pseudozyma sp*

Сквален – тритерпеновый углеводород, биохимический предшественник всех стероидов в растениях и животных [43]. Он является основным компонентом поверхностных липидов человека, в частности кожного сала. Сквален находит широкое применение в пищевой, фармацевтической и медицинской промышленности [44]. В основном он используется в качестве диетической добавки, адьюванта для вакцин, увлажняющего средства, кардиопротектора, противоопухолевого агента и природного антиоксиданта. В связи с ростом спроса на сквален, а также в связи с запретом на использование сквалена, полученного из акул, возникла необходимость поиска альтернативных вариантов производства сквалена, которые были бы недорогими и устойчивыми. Микробные платформы рассматриваются как потенциальный вариант для решения этих задач. Значительный прогресс был достигнут при использовании штаммов микроорганизмов как дикого типа, так и сконструированных для повышения производительности и выхода

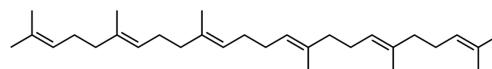


Рис. 5. Сквален

Fig. 5. Squalene

да сквалена, например, дрожжи *Pseudozyma sp.* SD301 (рис. 5) [45].

Для повышения выхода сквалена, используя олеогенный штамм *Pseudozyma sp.* SD301 в качестве исходного материала, был отобран [46] мутантный штамм с высоким выходом сквалена, полученный после облучения пучком ионов углерода $^{12}\text{C}^{6+}$. При дозе облучения пучком тяжелых ионов углерода 120 Гр был получен мутант PS120 с более высоким выходом сквалена, чем у исходного штамма. Через 3 дня культивирования выход сквалена у мутанта достиг 1,33 г/л, а масса сквалена – 41,31 мг/г. Зеленый флуоресцентный белок EGFP был использован в качестве маркера для оптимизации условий электротрансформации PS120. Результаты ферментного переваривания, электрофореза и секвенирования показали, что ген, кодирующий EGFP, может быть успешно перенесен в клетки PS120 под напряжением 900 В. Высокий уровень экспрессии белка EGFP в клетках PS120 был дополнительно подтвержден с помощью лазерного конфокального микроскопа.

Мутационная селекция дрожжей для саке

Одним из главных факторов, обуславливающих вкус фруктового саке, является присутствие яблочной кислоты, которая вырабатывается дрожжами во время брожения. Основной целью следующего исследования [47] было выделить штамм дрожжей с высокой продуктивностью яблочной кислоты путем облучения пучками тяжелых ионов.

Для этого пластины с родительским дрожжевым штаммом T-66 облучали пучками ионов Fe (790 кэВ/мкм) с дозой 500 Гр. После инкубации при 30 °C в течение 5 дней из пластин были выделены 88 мутантных штаммов дрожжей. Результаты ферментации показали, что 7 штаммов генерируют больше яблочной кислоты (726–1100 мг/л), чем исходная культура (639 мг/л).

Повышение белкового содержания в кормовых дрожжах

Содержание белка в корме является ключевым показателем для оценки качества корма. Содержание белка в кормовых дрожжевых штаммах напрямую определяет содержание белка в корме, поэтому становится ключевым моментом для получения хороших кормовых дрожжевых штаммов [48]. В данном исследовании [49] пучок тяжелых ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ с энергией 80 МэВ/нуклон был использован для индукции у стартовых дрожжей NJ3236 (содержание белка 40,64 %) мутагенеза и последующей селекции, а штаммы-мутанты были подвергнуты скринингу и ре скринингу для получения штамма 100G-2 с высоким содержанием белка. Содержание белка в штамме 100G-2 увеличилось на 10,08 % по сравнению со штаммом NJ3236. Оптимальное соотношение сред показало, что сок сладкого сорго составляет 20,95 г/л, кукурузный крутой щелок – 18,17 г/л, а сульфат магния – 1,60 г/л. При таких условиях концентрация растворимого белка достигла 1,381 мг/мл, что на 8,7 % выше, чем до оптимизации.

Микроводоросли

Nannochloropsis oceanica и производство липидсодержащей биомассы

Микроводоросли, например, *Nannochloropsis oceanica* [50], считаются одним из лучших видов сырья для производства биодизеля [51] благодаря своим характеристикам, таким как высокая скорость роста, высокое содержание триацилглицеринов, отсутствие конкуренции за землю с культурами, используемыми для производства продуктов питания, и рассматриваются как основное сырье для производства биодизеля в будущем. Для повышения продуктивности липидов в микроводорослях в качестве эффективного метода было предложено улучшение штаммов путем индуцированного облучением тяжелыми ионами клеточного мутагенеза и селекции мутантов.

Мутант HP-1 с высокой скоростью роста был получен из *Nannochloropsis oceanica* IMET1 путем мутагенеза с использованием тяжелого ионного облучения [52]. Энергия ионов углерода составляла 80 МэВ/нуклон. Среднее значение ЛПЭ составило 31 кэВ/мкм. Клетки водорослей облучали ионами углерода с различными дозами, включая 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 и 160 Гр. По сравнению с диким типом накопление биомассы и максимальная скорость роста HP-1 были увеличены на 19 и 6 %, а его липидная продуктивность была увеличена на 28 % – с 211 до 271 мг на литр в день. Последующий анализ показал, что фотосинтетическая эффективность HP-1 была выше, чем у дикого типа во время культивирования. Кроме того, анализ липидного состава показал, что содержание триацилглицеринов у HP-1 было на 14 % выше, а содержание полярных липидов – на 15 % ниже, чем у дикого типа.

Desmodesmus sp. и производство липидсодержащей биомассы

Похожее исследование было проведено для одноклеточной зеленой микроводоросли *Desmodesmus sp. S1* [53]. Этот дикий штамм может производить до 55 % общих липидов от сухого веса клеток в условиях высокой освещенности и ограничения по азоту. После облучения пучком тяжелых ионов $^{12}\text{C}^{6+}$ в дозах 10, 30, 60, 90 и 120 Гр и последующего скрининга полученных мутантов на 24-луночных микропланшетах было получено более 500 мутантов. Один из них, названный D90G-19, демонстрировал липидную продуктивность 0,298 грамм на литр в день, что на 20,6 % выше, чем у дикого типа предположительно благодаря улучшению максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m) фотосинтеза.

Aurantiochytrium sp. как производитель докозагексаеноевой кислоты

Докозагексаеноевая кислота (ДГК, C22:6 n-3), одна из полиненасыщенных жирных кислот класса омега-3, является незаменимой жирной кислотой в питании человека и играет важную роль в снижении заболеваемости некоторыми болезнями [54]. ДГК является не только компонентом клеточных мембран в тканях человека, таких как мозг и сетчатка глаза, но и необходима для неврологического и нейрофизиологического развития. По этим причинам ДГК добавляют в детские молочные смеси, а также в жировые добавки для взрослых. Океанические рыбы и продукты из рыбьего жира являются типичными диетическими источниками ДГК. Однако некоторые недостатки рыбьего жира, такие как содержание в нем морских загрязнителей, нежелательный рыбный привкус и окислительная нестабильность рыбьего жира, делают поиск альтернативных источников

ДГК все более привлекательным. Благодаря своим лучшим характеристикам по окислительной стабильности и пищевой безопасности по сравнению с рыбьим жиром, масло микроводорослей, например, *Aurantiochytrium sp./Schizochytrium sp.* стало основным альтернативным источником для коммерческого производства ДГК [55] (рис. 6).

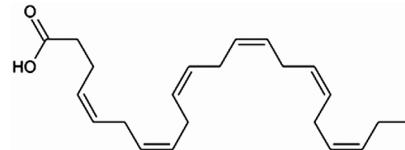


Рис. 6. Докозагексаеноевая кислота
Fig. 6. Docosahexaenoic acid

В исследовании [56] в качестве исходного штамма использовался дикий тип *Aurantiochytrium sp.* CGMCC 6208, и сначала была выявлена зависимость его жизнеспособности от доз тяжелого ионного облучения, а также исследована последующая реакция ростовых характеристик и метаболизма, особенно состава жирных кислот дикого типа *Aurantiochytrium sp.* CGMCC 6208 на ингибиторы еноил-АКФ-редуктазы (триклозан и изониазид) и холодовой стресс. Наконец, на основе тяжелоионного мутагенеза и синергетического эффекта ингибиторов еноил-АКФ-редуктазы и холодового стресса был разработан протокол получения мутантов *Aurantiochytrium sp.*, характеризующихся высоким выходом ДГК и стабильными показателями ферментации. Энергия ионов углерода составляла 80 МэВ/нуклон. Среднее значение ЛПЭ составило 31 кэВ/мкм. Клетки облучались ионами углерода с различными дозами, включая 40, 80, 120 Гр.

Было обнаружено, что мутанты с дозой облучения 120 Гр давали больше ДГК по сравнению с клетками, обработанными 40 Гр, 80 Гр и диким типом. В частности, по сравнению с диким типом, продуктивность и выход ДГК у мутанта Т-99 увеличились на 50 % – с 0,18 до 0,27 г/л в час и на 30 % – с 21 до 27 г/л соответственно.

Euglena gracilis как олеоген

Euglena gracilis – вид микроводорослей, относящийся к одноклеточным жгутиковым протистам, привлекает большое внимание как в промышленном, так и в научном отношении благодаря недавним достижениям в массовом ее культивировании, которые позволили экономически эффективно производить пищевые и косметические продукты [57]. Кроме того, известно, что она способна производить парамилон (β -1,3-глюкан в кристаллической форме) в качестве резервного полисахарида и превращать его в эфир воска в гипоксических и анаэробных условиях – перспективное сырье для производства биодизеля и авиационного биотоплива [58]. Тем не менее, остается ряд технических проблем, которые необходимо решить до того, как это сырье появится на конкурентном рынке топлива. В следующей работе [59] после индуцирования мутации с помощью облучения пучком ионов железа в дозе 50 Гр дикого штамма был выделен стабильный, богатый липидами мутантный штамм *Euglena gracilis*, названный B1ZFeL, с содержанием липидов в среднем на 40 % больше, чем у исходного.

Заключение

В данном обзоре описано применение технологии тяжелоионного лучевого мутагенеза для селекции различных микроорганизмов, таких как бактерии, мицелиаль-

ные грибы, дрожжи и микроводоросли. Мутационная селекция – очень важная технология для расширения доступного разнообразия биологических ресурсов. Тяжелоионные пучки вызывают у микроорганизмов высоколетальные и мутагенные эффекты, малое количество мутаций в локусе и крупномасштабные геномные изме-

нения, такие как большие вырезки, транслокации и инверсии. Исследования, описанные в данном обзоре, позволяют предположить, что применение ионно-лучевой мутагенной технологии для микроорганизмов полезно как для фундаментальной науки, так и для прикладных исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Saa P.A. Rational Metabolic Pathway Prediction and Design: Computational Tools and Their Applications for Yeast Systems and Synthetic Biology. *Synthetic Biology of Yeasts*. Ed. Darvishi Harzevili F. Springer, Cham, 2022. P. 2-25. doi.org/10.1007/978-3-030-89680-5_1.
- Huttanu H.M., Triola E.-K.H., Velasquez-Guzman J.C., Shin S.-M., Granja-Travez RS, Singh A., Dale T., Jha R.K. Targeted Mutagenesis and High-Throughput Screening of Diversified Gene and Promoter Libraries for Isolating Gain-of-Function Mutations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023;11:1202388. doi: 10.3389/fbioe.2023.1202388.
- Guo X., Ren J., Zhou X., Zhang M., Lei C., Chai R., Lu D. Strategies to Improve the Efficiency and Quality of Mutant Breeding Using Heavy-Ion Beam Irradiation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2023;44:5:735–752. doi.org/10.1080/07388551.2023.2226339.
- Hirano T., Kazama Y., Ishii K., Ohbu S., Shirakawa Y., Abe T. Comprehensive Identification of Mutations Induced by Heavy-Ion Beam Irradiation in *Arabidopsis Thaliana*. *The Plant Journal*. 2015; 82:1:93–104. doi.org/10.1111/tpj.12793.
- Aroumougame A., David J. Chen. Mechanism of Cluster DNA Damage Repair in Response to High-Atomic Number and Energy Particles Radiation. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;711:1–2:87–99. doi.org/10.1016/j.mrfmm.2010.11.002.
- Du Y., Zou W., Zhang K., Ye G., Yang J. Advances and Applications of Clostridium Co-culture Systems in Biotechnology. *Front. Microbiol.* 2020;11:560223. doi:10.3389/fmicb.2020.560223.
- Yuchen Liu, Yan Yuan, Ganesan Ramya, Shiv Mohan Singh, Nguyen Thuy Lan Chi, Arivalagan Pugazhendhi, Changlei Xia, Thangavel Mathimani. A Review on the Promising Fuel of the Future – Biobutanol: the Hindrances and Future Perspectives. *Fuel*. 2022;327:125166. doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125166.
- Cansu Birgen, Peter Dürre, Heinz A. Preisig, Alexander Wentzel. Butanol Production from Lignocellulosic Biomass: Revisiting Fermentation Performance Indicators with Exploratory Data Analysis. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:167. doi.org/10.1186/s13068-019-1508-6.
- Zhou X., Lu X.H., Li X.H., et al. Radiation Induces Acid Tolerance of *Clostridium Tyrobutyricum* and Enhances Bioproduction of Butyric Acid through a Metabolic Switch. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7:22. doi: org/10.1186/1754-6834-7-22.
- Gao Y., Zhang M., Zhou X., Guo X., Lei C., Li W., Lu D. Effects of Carbon Ion Beam Irradiation on Butanol Tolerance and Production of Clostridium Acetobutylicum. *Front. Microbiol.* 2020;11:602774. doi: 10.3389/fmicb.2020.602774.
- Li H.G., Luo W., Gu Q.Y., Wang Q., Hu W.-J., Yu X.B. Acetone, Butanol and Ethanol Production from Cane Molasses Using *Clostridium Beijerinckii* Mutant Obtained by Combined Low-Energy Ion Beam Implantation and N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine Induction. *Bioresource. Technol.* 2013;137:254–260. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.084.
- Jinshui Zheng, Stijn Wittouck, Elisa Salvetti, Charles M.A.P. Franz, Hugh M.B. Harris, Paola Mattarella, Paul W. O'Toole, Bruno Pot, Peter Vandamme, Jens Walter, Koichi Watanabe, Sander Wuyts, Giovanna E. Felis, Michael G. Gänzl, Sarah Lebeer. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70:4:2782–2858. doi.org/10.1099/ijsem.0.004107.
- Ashfaq Ahmad, Fawzi Banat, Hanifa Taher. A Review on the Lactic acid Fermentation from Low-Cost Renewable Materials: Recent Developments and Challenges. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;20:101138. doi.org/10.1016/j.eti.2020.101138.
- Jiang A.L., Hu W., Li W.-J., Liu L., Tian X.-J., Liu J., Wang S.-Y., Lu D., Chen J.-H. Enhanced Production of L-Lactic Acid by *Lactobacillus Thermophilus* SRZ50 Mutant Generated by High-Linear Energy Transfer Heavy Ion Mutagenesis. *Eng. Life Sci.* 2018;18:626–634. doi.org/10.1002/elsc.20180052.
- Cerna-Chávez E., Rodríguez-Rodríguez J.F., García-Conde K.B., Ochoa-Fuentes Y.M. Potential of *Streptomyces avermitilis*: a Review on Avermectin Production and Its Biocidal Effect. *Metabolites*. 2024;14:374. doi.org/10.3390/metabo14070374.
- Seung Bum Kim, Michael Goodfellow. *Streptomyces avermitilis* Sp. Nov., Nom. Rev., a Taxonomic Home for the Avermectin-Producing Streptomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:2011–2014. https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2011.
- El-Saber Batiha G., Alqahtani A., Ilesanmi O.B., Saati A.A., El-Mleeh A., Hetta H.F., Magdy Beshbishi A. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. *Pharmaceuticals*. 2020;13:196. doi.org/10.3390/ph13080196.
- Wang, Shu-Yang, Bo, Yong-Heng, Zhou, Xiang, Chen, Ji-Hong, Li, Wen-Jian, Liang, Jian-Ping, Xiao, Guo-Qing, Wang, Yu-Chen, Liu, Jing, Hu, Wei, Jiang, Bo-Ling. Significance of Heavy-Ion Beam Irradiation-Induced Avermectin B1a Production by Engineered *Streptomyces avermitilis*. *BioMed Research International*. 2017;5373262:13. doi.org/10.1155/2017/5373262.
- Alam K., Mazumder A., Sikdar S., Zhao Y.M., Hao J., Song C., Wang Y., Sarkar R., Islam S., Zhang Y., Li A. Streptomyces: the Biofactory of Secondary Metabolites. *Front. Microbiol.* 2022;13:968053. https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2022.968053.
- Fang Xiao, Tiyanont Kittichoat, Zhang Yi, Wanner Jutta, Boger Dale, Walker Suzanne. The Mechanism of Action of Ramoplanin and Enduracidin. *Mol. BioSyst.* 2006;2:1:69–76. doi.org/10.1039/B515328J.
- Lu Liu, Wei Hu, Wen-jian Li, Shu-yang Wang, Dong Lu, Xue-jiao Tian, Yan-qin Mao, Jing Liu, Ji-hong Chen. Heavy-Ion Mutagenesis Significantly Enhances Enduracidin Production by *Streptomyces Fungicidicus*. *Eng. Life Sci.* 2019;19:112–120. doi.org/10.1002/elsc.201800109.
- Gharibzahedi S.M.T., Razavi S.H., Mousavi S.M. Characterization of Bacteria of the Genus Dietzia: an Updated Review. *Ann. Microbiol.* 2014;64:1–11. doi.org/10.1007/s13213-013-0603-3.
- Esatbeyoglu T., Rimbach G. Canthaxanthin: from Molecule to Function. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017;61:6. doi.org/10.1002/mnfr.201600469.
- Faramarz Khodaiyan, Seyed Hadi Razavi, Seyed Mohammad Mousavi. Optimization of Canthaxanthin Production by *Dietzia Natronolimnaea* HS-1 from Cheese whey Using Statistical Experimental Methods. *Biochemical Engineering Journal*. 2008;40:3:415–422. doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.016.
- Zhou X., Xie J.R., Tao L., et al. The Effect of Microdosimetric $^{12}\text{C}^{6+}$ Heavy Ion Irradiation and Mg^{2+} on Canthaxanthin Production in a Novel Strain of *Dietzia Natronolimnaea*. *BMC Microbiol.* 2013;13:213. doi.org/10.1186/1471-2180-13-213.
- Tobert J. Lovastatin and Beyond: the History of the HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003;2:517–526. doi.org/10.1038/nrd1112.
- Lass-Flörl C., Dietl A., Kontoyiannis D.P., Brock M. *Aspergillus Terreus* Species Complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021;34:e00311-20. doi.org/10.1128/CMR.00311-20
- Goswami S., Vidyarthi A.S., Bhunia B., Mandal T. A Review on Lovastatin and its Production. *J. Biochem. Tech.* 2012;4:1:581–587.
- Li S.W., Li M., Song H.P., et al. Induction of a High-Yield Lovastatin Mutant of *Aspergillus Terreus* by $^{12}\text{C}^{6+}$ Heavy-Ion Beam Irradiation and the Influence of Culture Conditions on Lovastatin Production Under Submerged Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011;165:913–925. doi.org/10.1007/s12010-011-9308-x.
- Behera B.C. Citric Acid from *Aspergillus Niger*: a Comprehensive Overview. *Critical Reviews in Microbiology*. 2020;46:6:727–749. doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815.
- Marin Berovic, Matic Legisa. Citric Acid Production. *Biotechnology Annual Review*. 2007;13:303–343. doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13011-8.
- Hu W., Liu J., Chen Jh., et al. A Mutation of *Aspergillus Niger* for Hyper-Production of Citric Acid from Corn Meal Hydrolysate in a Bioreactor. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2014;15:1006–1010. doi.org/10.1631/jzus.B1400132.
- Jiang B.L., Wang S.Y., Wang Y.C., et al. A High-Throughput Screening Method for Breeding *Aspergillus Niger* with $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beam-Improved Cellulase. *Nucl. Sci. Tech.* 2017;28:1. doi.org/10.1007/s41365-016-0157-8.
- Xiaoyu Ma, Ming Gao, Yuan Li, Qunhui Wang, Xiaohong Sun. Production of Cellulase by *Aspergillus Niger* through Fermentation of Spent Mushroom Substance: Glucose Inhibition and Elimination Approaches. *Process Biochemistry*. 2022;122:2:26–35. doi.org/10.1016/j.procbio.2022.09.029.

35. Rahul Ranjan, Rohit Rai, Smruti B. Bhatt, Prodyut Dhar. Technological Road Map of Cellulase: a Comprehensive Outlook to Structural, Computational, and Industrial Applications. *Biochemical Engineering Journal*. 2023;198:109020. doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020.
36. Yao X., Guo H., Zhang K., Zhao M., Ruan J., Chen J. Trichoderma and its Role in Biological Control of Plant Fungal and Nematode Disease. *Front. Microbiol.* 2023;14:1160551. doi.org/10.3389%2Ffmicb.2023.1160551.
37. Zheng Zhang, Jing Xing, Xuezhi Li, Xianqin Lu, Guodong Liu, Yinbo Qu, Jian Zhao. Review of Research Progress on the Production of Cellulase from Filamentous Fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;277;4:134539. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134539.
38. Li Z., Chen X., Li Z., et al. Strain Improvement of Trichoderma Viride for Increased Cellulase Production by Irradiation of Electron and $^{12}\text{C}^{6+}$ -Ion Beams. *Biotechnol Lett*. 2016;38:983–989. doi.org/10.1007/s10529-016-2066-7.
39. Patel A., Karageorgou D., Rova E., Katapodis P., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms*. 2020;8:434. doi.org/10.3390/microorganisms8030434
40. Kot A.M., Błażejak S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. Rhodotorula Glutinis – Potential Source of Lipids, Carotenoids, and Enzymes for Use in Industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:6103–6117. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8.
41. Wang J., Li R., Lu D., et al. A Quick Isolation Method for Mutants with High Lipid Yield in Oleaginous Yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009;25:921–925. doi.org/10.1007/s11274-009-9960-2.
42. Yan Ya-ping, Wang Ju-fang, Lu Dong, Dong Xi-cun, Gao Feng, Ma Liang, Li Wen-jian. Study on Yeast Mutant with High Alcohol Yield Fermented in Sweet Sorghum Juice Using Carbon Ion Irradiation. *Nuclear Physics Review*. 2009;26;3:269–273. doi:10.11804/NuclPhysRev.26.03.269.
43. José M. Lou-Bonafonte, Roberto Martínez-Beamonte, Teresa Sanclemente, Joaquín C. Surra, Luis V. Herrera-Marcos, Javier Sanchez-Marcos, Carmen Arnal, Jesús Osada. Current Insights into the Biological Action of Squalene. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018;62;15:e1800136. doi.org/10.1002/mnfr.201800136.
44. Spanova M., Daum G. Squalene – Biochemistry, Molecular Biology, Process Biotechnology, and Applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011;113:1299–1320. doi.org/10.1002/ejlt.201100203.
45. João Paulo Telles, Victoria Stadler Tasca Ribeiro, Letícia Kraft, Felipe Francisco Tuon. *Pseudozyma* spp. Human Infections: a Systematic Review. *Medical Mycology*. 2021;59;1:1–6. doi.org/10.1093/mmy/myaa025.
46. Xiao Yan, Wang Lu, Wang Sen, Cong Peihu, Lu Dong, Feng Yinggang, Cui Qiu, Song Xiaojin. Mutation and Selection of High Squalene Production Yeast *Pseudozyma* sp. Induced by Carbon-Ions Beam Irradiation and its Electroporation. *South China Fisheries Science*. 2022;18;2:98–104. doi:10.12131/20210294.
47. Baisho K., Tomioka H., Furuki Y., Hayashi Y., Abe T. Mutation Breeding of Sake Yeast Using Heavy-Ion-Beam Irradiation. *Riken Accel. Prog. Rep.* 2019;53:202.
48. Pieter De Brabander, Evelien Uitterhaegen, Tom Delmulle, Karel De Winter, Wim Soetaert. Challenges and Progress Towards Industrial Recombinant Protein Production in Yeasts: a Review. *Biotechnology Advances*. 2023;64:108121. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108121.
49. Liang Ma, Zeya Du, Xiang Zhou, Jihong Chen. Screening and Breeding of High Yield Strain of Protein Feed Yeast and Optimization of its Fermentation Process. *Nuclear Physics Review*. 2022;39;4:512–518. doi:10.11804/NuclPhysRev.39.2022063.
50. Ye Y., Liu M., Yu L., Sun H., Liu J. *Nannochloropsis* as an Emerging Algal Chassis for Light-Driven Synthesis of Lipids and High-Value Products. *Mar. Drugs*. 2024;22:54. doi.org/10.3390/md22020054.
51. Zhang S., Zhang L., Xu G., Li F., Li X. A Review on Biodiesel Production from Microalgae: Influencing Parameters and Recent Advanced Technologies. *Front. Microbiol.* 2022;13:970028. doi.org/10.3389%2Ffmicb.2022.970028.
52. Yubin Ma, Zhiyao Wang, Ming Zhu, Changjiang Yu, Yingping Cao, Dongyuan Zhang, Gongke Zhou. Increased Lipid Productivity and TAG Content in *Nannochloropsis* by Heavy-Ion Irradiation Mutagenesis. *Bioresource Technology*. 2013;136:360–367. doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.020
53. Hu G., Fan Y., Zhang L., Yuan C., Wang J., Li W., et al. Enhanced Lipid Productivity and Photosynthesis Efficiency in a *Desmodesmus* sp. Mutant Induced by Heavy Carbon Ions. *PLoS ONE*. 2013;8;4:e60700. doi.org/10.1371/journal.pone.0060700.
54. Li J., Pora B.L.R., Dong K., Hasjim J. Health Benefits of Docosahexaenoic Acid and its Bioavailability: a Review. *Food Sci. Nutr.* 2021;9:5229–5243. doi.org/10.1002/fsn3.2299.
55. Munish Puri, Adarsha Gupta, Shweta Sahni. *Schizochytrium* sp. Trends in Microbiology. 2023;31;8:872–873. doi.org/10.1016/j.tim.2023.01.010.
56. Yu-rong Cheng, Zhi-jie Sun, Gu-zhen Cui, Xiaojin Song, Qiu Cui. A New Strategy for Strain Improvement of *Aurantiochytrium* sp. Based on Heavy-Ions Mutagenesis and Synergistic Effects of Cold Stress and Inhibitors of Enoyl-ACP Reductase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2016;93–94:182–190. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.08.019
57. Gissibl A., Sun A., Care A., Nevalainen H., Sunna A. Bioproducts from *Euglena Gracilis*: Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:108. doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108.
58. Frédérique Feuzing, Jean Pierre Mbakidi, Luc Marchal, Sandrine Bouquillon, Eric Leroy. A Review of Paramylon Processing Routes from Microalga Biomass to Non-Derivatized and Chemically Modified Products. *Carbohydrate Polymers*. 2022;288:119181. doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119181
59. Yamada K., Suzuki H., Takeuchi T., et al. Efficient Selective Breeding of Live Oil-Rich *Euglena Gracilis* with Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Sci. Rep.* 2016;6:26327. doi.org/10.1038/srep26327.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для коллегиации ARIADNA комплекса NICA (FEFN-2024-0002, FFRS-2024-0019 и FEFN-2024-0006).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.10.2024. Принята к публикации: 25.11.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the ARIADNA collaboration of the NICA complex (FEFN-2024-0002, FFRS-2024-0019 and FEFN-2024-0006).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.10.2024. Accepted for publication: 25.11.2024.