

УДК 579.66+547.92

**ТРАНСФОРМИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ШТАММОВ РОДОКОККОВ В ОТНОШЕНИИ В-СИТОСТЕРОЛА****<sup>1</sup>Ноговицина Е.М., <sup>2</sup>Гришко В.В., <sup>3</sup>Бажутин Г.А.**<sup>1</sup>ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук», Пермь, e-mail: [nogov@iegm.ru](mailto:nogov@iegm.ru);<sup>2</sup>ФГБУН «Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук», Пермь, e-mail: [grishvic@gmail.com](mailto:grishvic@gmail.com);<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, e-mail: [kdozhdy@rambler.ru](mailto:kdozhdy@rambler.ru)

С использованием актинобактерий рода *Rhodococcus*, поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768) [7] проведены сравнительные исследования способности нативных и мутантных бактериальных штаммов родококков к биотрансформации β-ситостерола – одного из наиболее доступных стеролов растительного происхождения. Показана эффективность метода неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза для повышения трансформирующей активности родококков в отношении β-ситостерола. Определены оптимальные условия биотрансформации исходного стерола в высоких (2, 6 и 10 г/л) концентрациях с образованием фармакологически активного соединения стигмаст-4-ен-3-она. Выявлено, что в процессе биотрансформации β-ситостерола нерастущими клетками родококков, предварительно адаптированными к исходному стеролу, регистрируется высокий (до 75 %) уровень образования ацетата β-ситостерола.

**Ключевые слова:** биотрансформация, актинобактерии рода *Rhodococcus*, растительные стеролы, β-ситостерол, фармакологически активные соединения

**B-SITOSTEROL-TRANSFORMING ACTIVITY OF NATIVE AND MUTANT RHODOCOCCLUS STRAINS****<sup>1</sup>Nogovitsina E.M., <sup>2</sup>Grishko V.V., <sup>3</sup>Bazhutin G.A.**<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, e-mail: [nogov@iegm.ru](mailto:nogov@iegm.ru);<sup>2</sup>Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, e-mail: [grishvic@gmail.com](mailto:grishvic@gmail.com);<sup>3</sup>Perm State University, Perm, e-mail: [kdozhdy@rambler.ru](mailto:kdozhdy@rambler.ru)

The genus *Rhodococcus* actinobacteria from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (official acronym IEGM, WFCC № 768) [7] were used in the comparative studies on the abilities of native and mutant bacterial strains to biotransform β-sitosterol, one of the most available plant sterols. A non-specific *in vivo* Tn5-mutagenesis procedure proved to be efficient to produce mutant *Rhodococcus* strains with a high β-sitosterol-transforming activity. Optimal conditions for biotransformation of high (2, 6 and 10 g/l) β-sitosterol concentrations to produce a pharmacologically active compound stigmast-4-en-3-one were determined. It was found that β-sitosterol biotransformation using resting rhodococcal cells pre-adapted to this sterol resulted in good (75 %) acetate β-sitosterol formation.

**Keywords:** biotransformation, genus *Rhodococcus* actinobacteria, plant sterols, β-sitosterol, pharmacologically active compounds

Каталитические свойства микробных ферментов позволяют эффективно трансформировать труднодоступные для химической модификации области молекулы природных стеролов. Микробиологическая трансформация данных соединений в андрост-4-ен-3,17-дион и андроста-1,4-диен-3,17-дион – ключевые интермедиаты в синтезе лекарственных гормональных препаратов является традиционной технологией, применяемой в промышленном производстве стероидов [6]. В исследованиях по микробиологической трансформации стеролов особое внимание уделяется представителям, выделяемым из отходов деревообрабатывающей промышленности (β-ситостеролу, в частности). Преимущество

использования β-ситостерола и его аналогов заключается в тотальном распространении их в природе, доступности и относительно низкой стоимости исходного сырья [6]. Область исследования каталитических возможностей микроорганизмов в отношении данных соединений постоянно пополняется новыми данными, исследуется трансформирующая способность ранее мало используемых бактериальных штаммов и их мутантных клонов, проводится оптимизация биотрансформационного процесса в условиях добавления высоких концентраций стеролов и т. п. Ранее нами [1, 2, 4] с использованием нативных штаммов родококков, поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, проведены сравнительные исследования способности нативных и мутантных бактериальных штаммов родококков к биотрансформации β-ситостерола – одного из наиболее доступных стеролов растительного происхождения. Показана эффективность метода неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза для повышения трансформирующей активности родококков в отношении β-ситостерола. Определены оптимальные условия биотрансформации исходного стерола в высоких (2, 6 и 10 г/л) концентрациях с образованием фармакологически активного соединения стигмаст-4-ен-3-она. Выявлено, что в процессе биотрансформации β-ситостерола нерастущими клетками родококков, предварительно адаптированными к исходному стеролу, регистрируется высокий (до 75 %) уровень образования ацетата β-ситостерола.

трофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768) [7], исследован процесс биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в концентрациях 0,5–2,0 г/л. Определены основные метаболические пути его модификации, при этом в качестве продуктов обнаружены биологически активные соединения стигмаст-4-ен-3-он, андрост-4-ен-3,17-дион, андроста-1,4-диен-3,17-дион и ацетат  $\beta$ -ситостерола.

Цель настоящей работы – исследование трансформирующей активности нативных и мутантных штаммов родококков в отношении  $\beta$ -ситостерола в зависимости от его исходной (0,5–10 г/л) концентрации.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали чистые культуры родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768) [7], принадлежащие к видам *Rhodococcus erythropolis* (21 штамм) и *R. ruber* (8 штаммов). В отдельных экспериментах использовали мутантные клоны *R. ruber* ИЭГМ 231, полученные методом неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза [3]. Для получения УФ мутантов клетки *R. ruber* ИЭГМ 381 выращивали в питательной среде (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; глицерин – 10,0; дрожжевой экстракт – 4,0. Через 48 ч клетки стерильно отделяли от среды центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды промывали фосфатно-щелочным буфером ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ) pH 7,0. Полученную суспензию (ОП<sub>600</sub> 2,5) облучали с помощью УФ лампы ДРТ-240 (Россия) в течение 5 мин. Химический мутагенез клеток *R. ruber* ИЭГМ 233, предварительно выращенных в мясопептонном бульоне и промытых ацетатным буфером pH 4,5, проводили в течение 10 мин при 28 °C в 0,05 М растворе азотистой кислоты ( $\text{HNO}_2$ ), затем для остановки реакции добавляли среду 1ХА [5]. Колонии УФ и  $\text{HNO}_2$  мутантов получали после высева клеточных суспензий на чашки Петри с мясопептонным агаром и инкубации в течение 24 ч при 28 °C.

Родококки выращивали в условиях периодического культивирования на орбитальной качалке Certomat IS «Sartorius» (Германия) (150 об/мин) при 28 °C. Базовый состав минеральной среды включал следующие компоненты (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,02. В среду добавляли 1 г/л дрожжевого экстракта, 0,1 об. % раствора микроэлементов по Постгейту и 0,7 г/л *n*-гексадекана. В исследованиях по подбору оптимальных условий биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в высоких концентрациях в среду вносили 1,2 г/л *n*-гексадекана и 0,015 г/л пальмитиновой кислоты.  $\beta$ -Ситостерол добавляли в инкубационную среду одновременно с инокулятом или через 48 ч роста родококков в концентрации 0,5; 2,0; 6,0 или 10,0 г/л в виде 10 % раствора в изопропанол или смеси с  $\beta$ -циклодекстрином (1:1) в 1,2 % водном растворе Твина-80. Исследования по биотрансформации  $\beta$ -ситостерола нерастущими клетками прово-

дили в фосфатно-щелочном буфере ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ) pH 6, 7 или 8.

В качестве посевного материала использовали родококки ( $5,0 \times 10^5$  клеток/мл), выращенные на мясопептонном агаре и отобранные в экспоненциальной фазе роста. Эксперименты по биотрансформации  $\beta$ -ситостерола нерастущими клетками родококков проводили с использованием бактериальных культур, выращенных на агаризованной среде состава (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,002; глюкоза – 5,0, дрожжевой экстракт – 10,0 с добавлением 0,2 г/л  $\beta$ -ситостерола в виде 10 % раствора в изопропанол.

В работе применяли реактивы российских производителей марки «х.ч.» или «ч.д.а.» и фирмы «Sigma-Aldrich» (США). В экспериментах использовали  $\beta$ -ситостерол 70,0 % чистоты «Sigma-Aldrich» (США). Образец стигмаст-4-ен-3-она получен из Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ацетат  $\beta$ -ситостерола синтезировали как описано ранее [1]. Продукты микробного окисления  $\beta$ -ситостерола экстрагировали этилацетатом (3  $\times$  50 мл). Объединенные экстракты высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель удаляли на роторном испарителе. Качественный и количественный состав полученных смесей анализировали методом тонкослойной хроматографии с использованием пластин «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-УФ фирмы ЗАО «Сорбполимер» (Россия) [4], УФ-спектроскопии на спектрофотометре Lambda EZ201 «Perkin-Elmer» (США) и хроматомасс-спектрометрической системы Agilent 6890/5973N (кварцевая колонка HP-5MS SN US 15189741-1) «Agilent technology» (США). Эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel 2003, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку.

### Результаты исследования и их обсуждение

По нашим данным, представители *R. ruber* эффективно (55–98 %) трансформируют  $\beta$ -ситостерол (0,5 г/л) с образованием стигмаст-4-ен-3-она при условии добавления исходного стерола через 2 суток роста бактериальных клеток в среде с *n*-гексадеканом (рис. 1, А). Генетическая модификация штаммов, обладающих в присутствии *n*-гексадекана низкой стерол-трансформирующей активностью, методом неспецифического *in vivo* Tn5-мутагенеза позволяет значительно повысить их способность к биотрансформации  $\beta$ -ситостерола. Получены мутантные клоны Tn5-11, Tn5-25, Tn5-29, Tn5-37, катализирующие 60 % конверсию  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он, что в 4 раза выше таковой исходной культуры *R. ruber* ИЭГМ 231 (рис. 1, Б).

В отдельных экспериментах установлено, что внесение в среду с *n*-гексадеканом 0,15 г/л пальмитиновой кислоты в качестве индуктора ферментативной активности представителей вида *R. erythropolis* обеспечивает эффективное получение стигмаст-4-ен-3-она при добавлении  $\beta$ -ситостерола

одновременно с инокулятом. В результате исследования способности родококков трансформировать  $\beta$ -ситостерол в концентрации 2,0 г/л выявлено, что степень образования стигмаст-4-ен-3-она при использовании Твина-80 в качестве растворителя исходного стерола в среднем составляет 19%. Лишь отдельные штаммы *R. erythropolis* (ИЭГМ 10 и ИЭГМ 487, в частности) катализируют 44,9–49,5% конверсию  $\beta$ -ситостерола в целевой продукт.

Более высокая степень биотрансформации  $\beta$ -ситостерола достигается в условиях его добавления в виде смеси с  $\beta$ -циклодекстрином ( $\beta$ -ЦД) и Твином-80, при этом каталитическая активность штаммов *R. erythropolis*, как правило, в 1,1–6,0 раз превышает таковую *R. ruber*. Максимальная (77,3–79,1) степень биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он регистрируется при использовании *R. erythropolis* ИЭГМ 179 и ИЭГМ 487 (рис. 2).

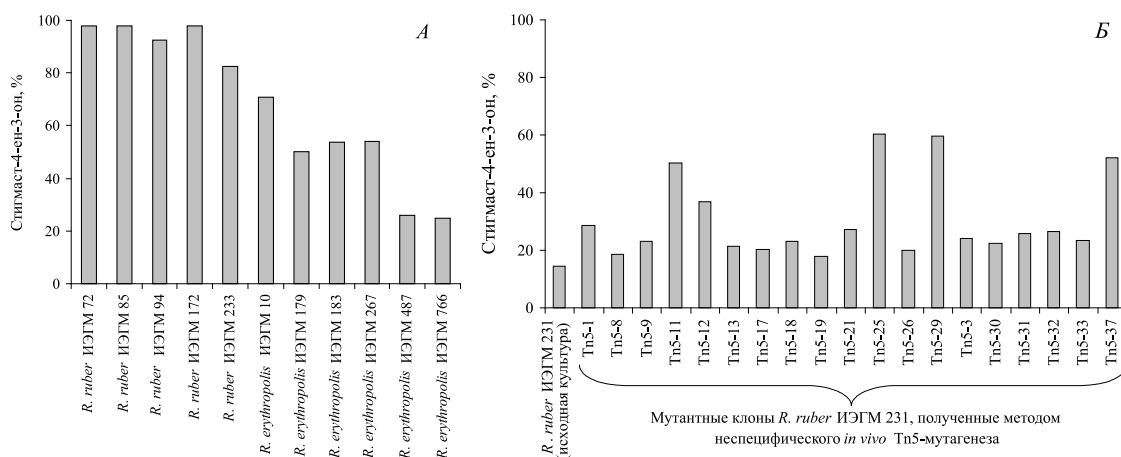


Рис. 1. Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он в присутствии *n*-гексадекана в условиях внесения  $\beta$ -ситостерола через 2 суток роста родококков. А – нативными штаммами, Б – мутантными клонами *R. ruber* ИЭГМ 231

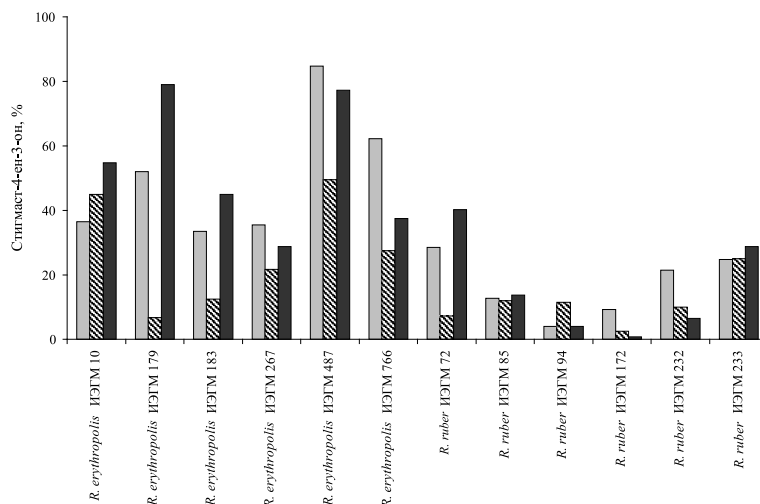


Рис. 2. Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола родококками в присутствии *n*-гексадекана (0,25%) и пальмитиновой кислоты (0,015%) в условиях добавления 0,5 г/л исходного стерола в 5 мл изопропанола (□); 2,0 г/л в 20 мл Твина-80 (▨); 2,0 г/л в виде смеси с  $\beta$ -ЦД(1:1) в 40 мл 1,2% водного раствора Твина-80 (■).  $\beta$ -Ситостерол вносили в инкубационную среду одновременно с инокулятом. Приведены данные после 5 сут культивирования родококков

Установлено, что методы химического и УФ-мутагенеза не способствуют повышению стеролтрансформирующей активности представителей *R. ruber*. Так, степень образования стигмаст-4-ен-3-она мутантными клонами *R. ruber* ИЭГМ 233 и ИЭГМ 381 в условиях добавления 2,0 г/л  $\beta$ -ситостерола

снижается в 2,4–5,3 раза по сравнению с исходными культурами (таблица).

Дальнейшие эксперименты проводили с использованием представителей *R. erythropolis*, наиболее эффективно трансформирующих  $\beta$ -ситостерол в концентрации 2,0 г/л.

Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола мутантными клонами *R. ruber*

| Химический мутагенез                            |                       | УФ мутагенез                                    |                       |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
| Мутантный клон                                  | Стигмаст-4-ен-3-он, % | Мутантный клон                                  | Стигмаст-4-ен-3-он, % |
| <i>R. ruber</i> ИЭГМ 233<br>(исходная культура) | 28,7 $\pm$ 8,34       | <i>R. ruber</i> ИЭГМ 381<br>(исходная культура) | 20,3 $\pm$ 7,92       |
| 233-9                                           | 10,4 $\pm$ 4,75       | 381-1                                           | 8,5 $\pm$ 3,14        |
| 233-11                                          | 5,8 $\pm$ 2,16        | 381-9                                           | 8,2 $\pm$ 2,08        |
| 233-14                                          | 5,1 $\pm$ 1,44        | 381-10                                          | 8,1 $\pm$ 1,97        |
| 233-15                                          | 8,6 $\pm$ 3,81        | 381-16                                          | 7,5 $\pm$ 0,84        |
| 233-19                                          | 5,4 $\pm$ 1,32        | 381-18                                          | 8,2 $\pm$ 2,43        |

**Пр и м е ч а н и е :** Биотрансформацию  $\beta$ -ситостерола проводили в присутствии *n*-гексадекана (0,25 %) и пальмитиновой кислоты (0,015 %) в условиях добавления 2 г/л исходного стерола в виде смеси с  $\beta$ -ЦД (1:1) в 40 мл 1,2 % водного раствора Твина-80.

Установлено, что в условиях добавления 6,0 г/л исходного стерола в виде смеси с  $\beta$ -ЦД и Твином-80 штаммы *R. erythropolis* проявляют, как правило, высокую (более 90 %) стерол-

трансформирующую способность (рис. 3, А). При повышении концентрации  $\beta$ -ситостерола до 10 г/л активность большинства исследуемых культур не превышает 60 % (рис. 3, А, Б).

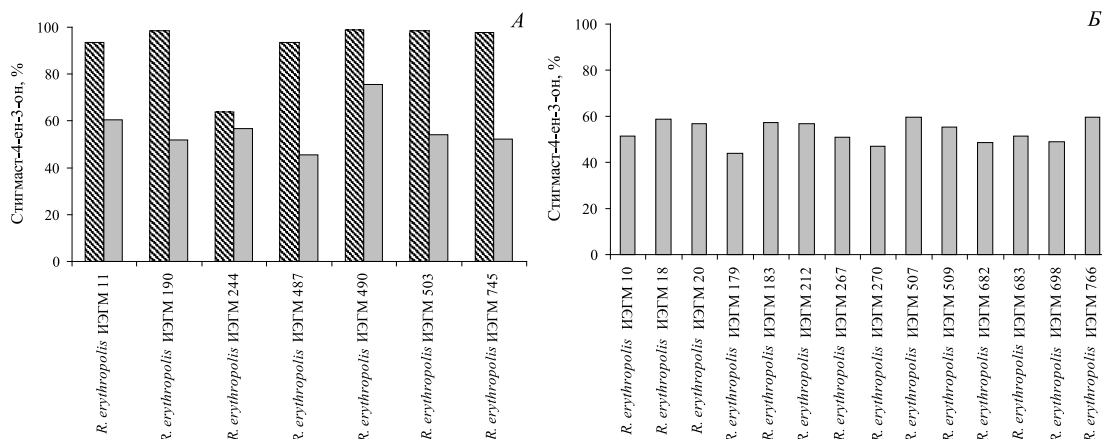
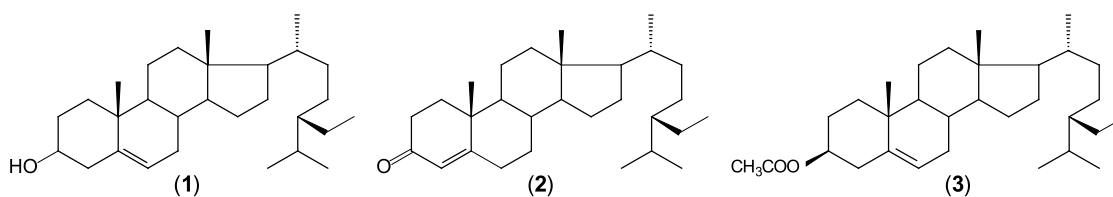


Рис. 3. Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола представителями *R. erythropolis* в условиях добавления 6 (▨) или 10 (■) исходного стерола в виде смеси с  $\beta$ -ЦД (1:1) в 1,2 % водном растворе Твина-80. Приведены данные после 5 суток культивирования родококков

Наиболее высокий (75,4–98,9 %) уровень конверсии  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он достигается при использовании *R. erythropolis* ИЭГМ 490.

Физиологическое состояние бактериальных клеток может оказывать значительное влияние на процесс биотрансформации органических соединений, в связи с этим нами проведены эксперименты по оценке способности нерастущих клеток родококков к биотрансформации  $\beta$ -ситостерола. С использованием культур *R. erythropolis* ИЭГМ 487 и *R. ruber* ИЭГМ 233, обладающих в присут-

ствии *n*-гексадекана высокой стеролтрансформирующей активностью, установлено, что в процессе инкубации бактерий в фосфатно-щелочном буфере с добавлением  $\beta$ -ситостерола (2,0 г/л) в качестве продукта трансформации исходного стерола обнаруживается ацетат  $\beta$ -ситостерола. Максимальная (75 %) степень образования данного продукта регистрируется в кислой реакции среды при использовании клеток *R. ruber* ИЭГМ 233, предварительно выращенных в глюкозосодержащей среде с добавлением  $\beta$ -ситостерола в качестве индуктора.





Таким образом, в результате проведенных исследований определены основные особенности процесса биотрансформации  $\beta$ -ситостерола (1) нативными и мутантными штаммами родококков с образованием стигмат-4-ен-3-она (2). Детально исследована способность *R. erythropolis* к биотрансформации исходного стерола в высоких (2, 6 или 10 г/л) концентрациях. Проведена оценка способности не растущих клеток родококков к биотрансформации  $\beta$ -ситостерола, при этом в качестве продукта реакции обнаружен ацетат  $\beta$ -ситостерола (3).

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края (проект № 14-04-69005-р\_урал\_a).*

#### Список литературы

1. Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола и его сложных эфиров актинобактериями рода *Rhodococcus* / И.Б. Ившина, В.В. Гришко, Е.М. Ноговицина, Т.П. Кукина, Г.А. Толстиков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 626–633.
2. Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Ившина И.Б. Биокаталитическое получение физиологически активных соединений на основе растительного  $\beta$ -ситостерола // Катализ в промышленности. – 2009. – № 1. – С. 67–74.
3. Исследование адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus* с помощью Tn5 мутагенеза / А.В. Криворучко, Е.В. Рубцова, М.К. Серебренникова, М.С. Куюкина, И.Б. Ившина // Ученые записки КГУ. Серия Естественные науки. – 2008. – Т. 150, № 4. – С. 143–147.
4. Ноговицина Е.М. Гришко В.В. Ившина И.Б. Биокаталитическое получение фармакологически перспективного стигмат-4-ен-3-она с использованием клеток родококков // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37, № 5. – С. 697–704.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 440 с.
6. Malaviya A., Gomes J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols // Bioresour. Technol. – 2008. – Vol. 99, No. 15. – P. 6725–6737.
7. Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms, Available at: <http://www.iegml.ru/iegmlcol> (accessed 22 may 2014).

#### References

1. Ivshina I.B., Grishko V.V., Nogovitsina E.M., Kukina T.P., Tolstikov G.A. Biotransformatsiya  $\beta$ -sitosterola i yego slozhnykh efirov aktinobakteriyami roda *Rhodococcus* // Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya. 2005. Vol. 41, no. 6. pp. 626–633.
2. Grishko V.V., Nogovitsina E.M. Ivshina I.B., Biokataliticheskoye polucheniye fiziologicheskikh aktivnykh soyedineniy na osnove rastitelnogo  $\beta$ -sitosterola // Kataliz v promyshlennosti. 2009. no. 1. P. 67–74.
3. Krivoruchko A.V., Rubtsova E.V., Serebrennikova M.K., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Issledovaniye adgezivnykh svoystv aktinobakteriy roda *Rhodococcus* s pomoshchyu Tn5 mutageneza // Ucheniye zapiski KGU. Seriya Yestestvenniye nauki. 2008. Vol. 150, no. 4. pp. 143–147.
4. Nogovitsina E.M., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biokataliticheskoye polucheniye farmakologicheskikh perspektivnogo stigmast-4-en-3-ona s ispolzovaniyem kletok rodokokkov // Bioorganicheskaya khimiya 2011. V. 37, no. 5. pp. 697–704.
5. Miller Dzh. Eksperimentyi v molekulyarnoy genetike. M.: Mir, 1976. 440 p.
6. Malaviya A., Gomes J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols // Bioresour. Technol. 2008. Vol. 99, no. 15. pp. 6725–6737.
7. Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms, Available at: <http://www.iegml.ru/iegmlcol> (accessed 22 may 2014).

#### Рецензенты:

Вихарева Е.В., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», г. Пермь;

Володин В.В., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимии и биотехнологии растений, Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

Работа поступила в редакцию 05.09.2014.