

ЭФФЕКТИВНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ПРИРОДНЫХ СТЕРОЛОВ*

Е.М. Ноговицина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Г.А. Бажугин, *Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет*

В.В. Гришко, *Институт технической химии УрО РАН*

А.А. Елькин, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный национальный исследовательский университет*

Е.В. Тарасова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Т.И. Кылосова, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*

К.М. Черемных, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

С использованием актинобактерий рода *Rhodococcus* исследован процесс бактериальной трансформации стеролов растительного и животного происхождения с целью получения на их основе фармакологически активных соединений. Установлено, что представители *Rhodococcus erythropolis*, растущие в присутствии н-гексадекана и пальмитиновой кислоты, эффективно (до 99%) трансформируют β -ситостерол в высокой (2–10 г/л) концентрации с образованием фармакологически активного стигмаст-4-ен-3-она. Исследован процесс биотрансформации 10 г/л β -ситостерола в условиях биореактора. Установлено, что степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигает 40% после 22 суток от начала эксперимента. Исследована способность родококков, иммобилизованных на поверхности технической полимерной ткани, к биотрансформации β -ситостерола в условиях фосфатно-щелочного буфера (рН 7). Отобран штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 487, катализирующий в данных условиях наиболее эффективную (50%) трансформацию исходного субстрата в стигмаст-4-ен-3-он. Степень образования целевого продукта зависит от количества единиц носителя с закрепленными бактериями (фрагментов ткани площадью 1 см²). Проведены сравнительные исследования процесса биотрансформации стеролов с насыщенным углеродным остовом в присутствии н-гексадекана или глюкозы. Впервые обнаружена способность родококков к окислительной трансформации 5 α -холестан-3 β -ола с образованием 5 α -холестан-3-она. Отобраны штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 490, ИЭГМ 766, ИЭГМ 1017 и ИЭГМ 1018, проявляющие высокую (87-100%) трансформирующую активность в отношении 5 α -холестан-3 β -ола независимо от используемого источника углерода.

Ключевые слова: биотрансформация, родококки, иммобилизация, стеролы, β -ситостерол, стигмаст-4-ен-3-он, 5 α -холестан-3 β -ол, 5 α -холестан-3-он, фармакологически активные соединения.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края (грант № 14-04-96005).

Использование технологий биокатализа в промышленном производстве фармацевтических препаратов позволяет осуществлять регио- и стереоселективную модификацию сложных по структуре органических соединений, в том числе труднодоступных для химического синтеза центров молекулы, в экологически безопасных условиях, без применения дорогостоящих и агрессивных реагентов. Холестерол, получаемый из животных жиров, стеролы растительного происхождения (β -ситостерол и смеси β -ситостерола с кампестеролом или стигмастеролом, называемые «фитостерол»), а также сапогенины (диосгенин, соласодин) являются основным источником стероидных гормонов [1] (рис. 1).

Микробиологическая трансформация стеролов с образованием ключевых предшественников в синтезе лекарственных гормональных препаратов (андрост-4-ен-3,17-диона и андроста-1,4-диен-3,17-диона) – традиционная биокаталитическая технология, применяемая в промышленном производстве стероидных соединений. Особенность процесса биотрансформации стеролов заключается в возможности получения на их основе разнообразных продуктов. Наряду с характерными метаболитами биоконверсии стеролов постоянно выявляются новые каталитические свойства микроорганизмов в отношении данных субстратов. Так, с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus* нами разработан способ селективной био-

конверсии β -ситостерола в фармакологически активный стигмаст-4-ен-3-он [2].

Известно, что физиологическое состояние бактериальных клеток может оказывать значительное влияние на процесс биотрансформации органических веществ. В основном подбор оптимальных условий процесса биотрансформации стеролов проводится с использованием бактерий, активно растущих в жидких питательных средах. Вместе с тем применение не растущих и иммобилизованных форм биокатализаторов позволяет значительно сократить продолжительность процесса биотрансформации, который может проводиться в нестерильных условиях, в присутствии высоких концентраций субстратов [3].

С использованием актинобактерий рода *Rhodococcus*, поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекций культур, www.iegmcol.ru, реестровый номер уникальной научной установки www.ckr-gf.ru/usu/73559), нами исследован процесс бактериальной трансформации стеролов растительного и животного происхождения с целью получения на их основе фармакологически активных соединений.

Подобраны условия биотрансформации β -ситостерола в высоких (2–10 г/л) концентрациях с образованием стигмаст-4-ен-3-она. Установлено, что в условиях добавления 6,0 г/л исходного стерола в ви-

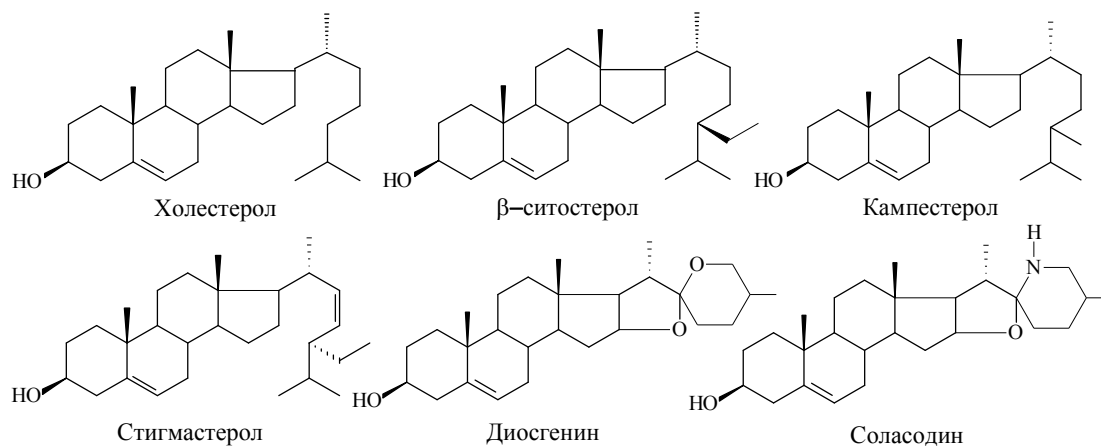


Рис. 1. Основные источники стероидов

де смеси с β -циклодекстрином и Твином-80 представители вида *R. erythropolis* проявляют высокую (более 93%) стерол-трансформирующую способность (рис. 2, а). При повышении концентрации β -ситостерола до 10 г/л активность большинства исследуемых культур составляет не более 60%. Наиболее высокой (75,4–98,9%) трансформирующей способностью обладает *R. erythropolis* ИЭГМ 490. С использованием данной культуры исследована биотрансформация β -ситостерола в условиях биореактора BioFlo/CelliGen 115 (New Brunswick Scientific, США). Установлено, что степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигает 40% после 22 суток от начала эксперимента (см. рис. 2, а). В процессе инкубации отмечено увеличение показателя pH с 6,3 до 7,5 (рис. 2, б).

С целью поиска условий эффективной биотрансформации β -ситостерола иммобилизованными родококками проведен подбор оптимальных носителей для закрепления бактерий на твердой поверхности. Установлено, что наиболее высокий (52–57%) уровень окислительной активности закрепленных клеток родококков в отношении β -ситостерола (0,5 г/л) достигается в присутствии глюкозы при использовании в качестве носителя технической полимерной ткани (ТПТ) из нитей СВМ арт. 56313 «Н» ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88 ООО «Укрматериал-

Инвест» (Украина). Необходимым условием эффективного получения стигмаст-4-ен-3-она является использование бактериальных культур, иммобилизованных после предварительной инкубации в среде Wilmańska [4] с добавлением β -ситостерола (рис. 3).

В результате серии проведенных экспериментов установлено, что биотрансформация β -ситостерола закрепленными бактериями в условиях фосфатно-щелочного буфера (pH 7) позволяет избежать обрастания носителя биомассой, увеличить концентрацию исходного субстрата (от 0,5 до 2 г/л) и сократить продолжительность процесса (с 5 до 2 сут.). Максимальный (50%) уровень биоконверсии β -ситостерола достигается при использовании культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 487. Установлено, что эффективность процесса биотрансформации β -ситостерола зависит от количества носителя с закрепленными клетками. Так, добавление в 50 мл буфера 15 или 20 фрагментов ткани с клетками площадью 1 см² приводит к снижению трансформирующей активности *R. erythropolis* ИЭГМ 487 на 10–24%, а наиболее эффективная конверсия наблюдается при использовании 10 единиц носителя. Штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 766 катализирует максимальный (48,6%) уровень биоконверсии при использовании 15 фрагментов носителя. Окислительная активность *R. ruber* ИЭГМ 233 не превышает 35% (рис. 4).

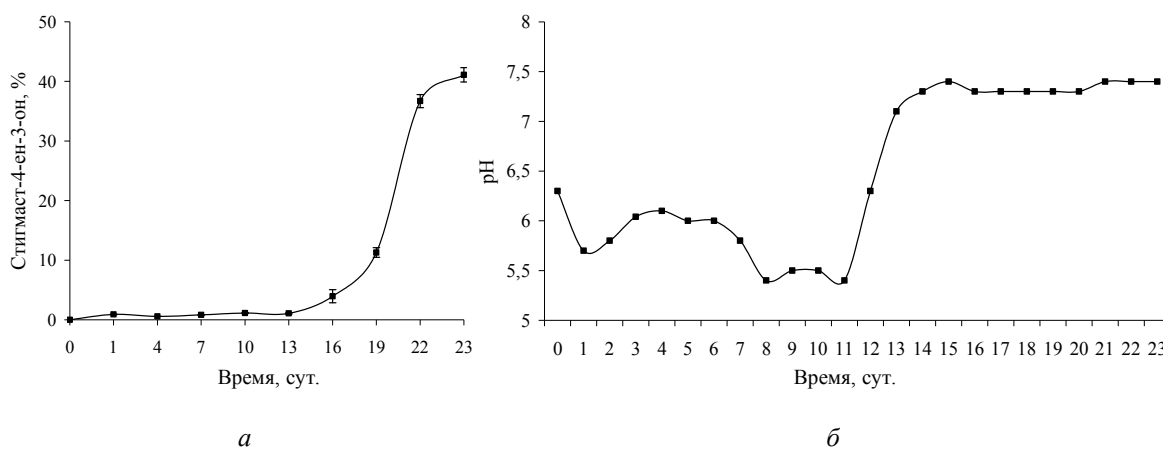


Рис. 2. Динамика степени образования стигмаст-4-ен-3-она (а) и показателя pH (б) в процессе биотрансформации β -ситостерола (10 г/л) в условиях биореактора. Эксперименты проводили с использованием культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 490. β -Ситостерол вносили в виде смеси с β -циклодекстрином (1:1) в 1,2% водном растворе Твина-80

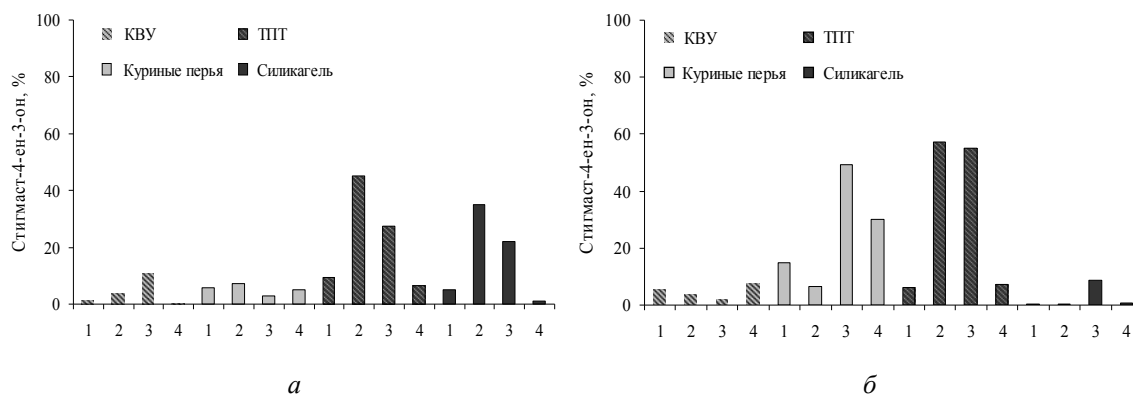


Рис. 3. Биотрансформация β -ситостерола (0,5 г/л) иммобилизованными клетками *R. ruber* ИЭГМ 233 в минеральной среде с добавлением *n*-гексадекана (1) или глюкозы (2), среде *Wilmańska* (3), фосфатно-щелочном буфере (4). Бактерии предварительно выращивали в среде *Wilmańska* без добавления (а) или с добавлением (б) 0,2 г/л β -ситостерола. Продолжительность процесса биотрансформации – 5 суток. КВУ – каталитический волокнистый углерод, ТПТ – техническая полимерная ткань

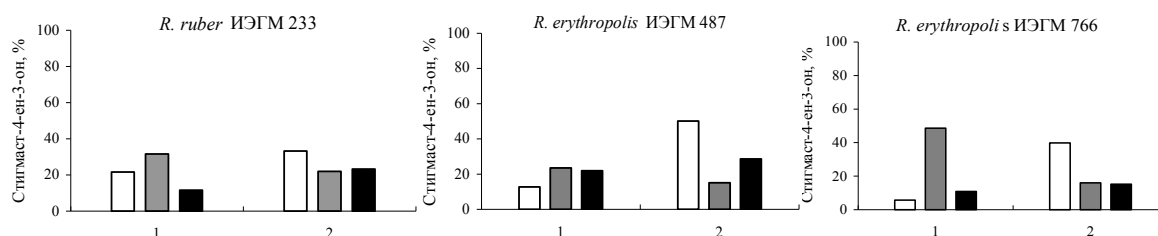


Рис. 4. Биотрансформация β -ситостерола в условиях фосфатно-щелочного буфера: 1 – иммобилизованными клетками; 2 – после иммобилизации клеток и их инкубации в течение 2 суток в присутствии глюкозы и 0,2 г/л β -ситостерола. Количество единиц носителя (фрагментов ткани с клетками площадью 1 см²) на 50 мл фосфатно-щелочного буфера: □ 10 ■ 15 ■ 20

В отдельных экспериментах установлено, что трансформирующие β -ситостерол коллекционные штаммы родококков способны аналогичным образом (по 3β -положению) окислять 5α -холестан- 3β -ол в концентрации 0,5 г/л с образованием 5α -холестан-3-она. Отобраны культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 490, ИЭГМ 766, ИЭГМ 1017 и ИЭГМ 1018, обладающие высокой (87–100%) трансформирующей активностью в отношении 5α -холестан- 3β -ола (рис. 5).

Таким образом, определены оптимальные условия биотрансформации β -ситостерола иммобилизованными клетками

родококков в фосфатно-щелочном буфере. Отобраны штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 490, ИЭГМ 766, ИЭГМ 1017 и ИЭГМ 1018, катализирующие селективную (87–100%) трансформацию 5α -холестан- 3β -ола в 5α -холестан-3-он независимо от используемого источника углерода. С применением культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 490 исследован процесс биотрансформации β -ситостерола в высокой (10 г/л) концентрации в условиях биореактора. Установлено, что степень образования стигмаст-4-ен-3-она при исходном рН 6,3 и дополнительной аэрации 0,3 л/мин достигает 40%.

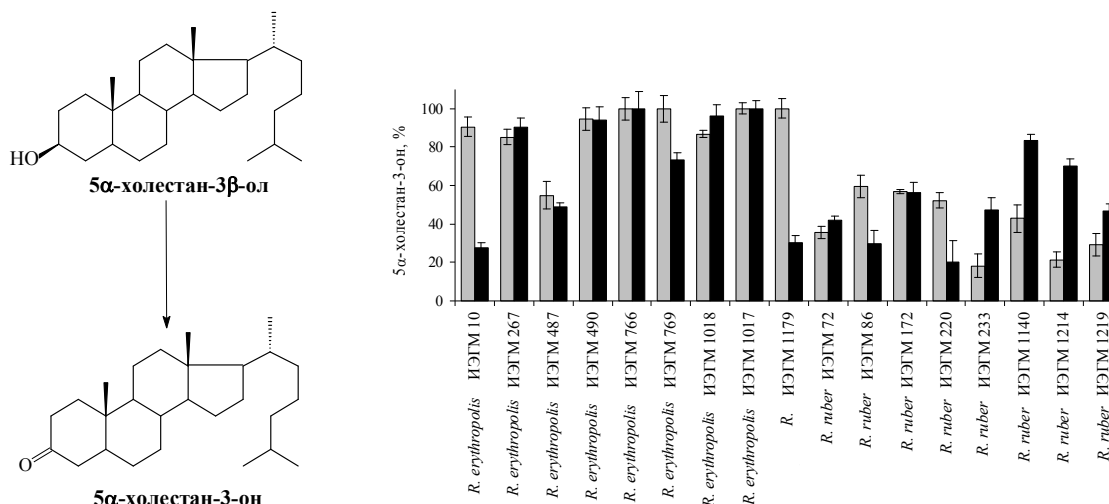


Рис. 5. Биотрансформация 5α-холестан-3β-ола родококками: в присутствии глюкозы ■ или n-гексадекана ■. Приведены данные после 5 суток процесса биотрансформации

Библиографический список

1. Bhatti H.N., Khera R.A. Biological transformations of steroidal compounds: a review // Steroids. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. 1267–90.
2. Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Ившина И.Б. Оптимизация условий биокаталитического получения стигмаст-4-ен-3-она // Химия природных соединений. – 2012. – № 3. – С. 390–392.
3. Wang Z., Zhao F., Chen D., Li D. Biotransformation of phytosterol to produce androstadienedione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system // Process Biochem. – 2006. – Vol. 41. – № 3. – P. 557–561.
4. Wilmańska D., Dziadek J., Sajduda A., Mileczarek K., Jaworski A., Murooka Y. Identification of cholesterol oxidase from fast-growing mycobacterial strains and *Rhodococcus* sp. // J. Ferment. Bioeng. – 1995. – Vol. 79. – № 2. – P. 119–124.

EFFECTIVE BIOCATALYSTS FOR THE PRODUCTION OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM NATURAL STEROLS

E.M. Nogovitsina¹, G.A. Bazhutin², V.V. Grishko³, A.A. Elkin^{1,4},
E.V. Tarasova¹, T.I. Kylosova⁴, K.M. Cheremnyh¹

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of RAS

² Perm State Humanitarian Pedagogical University

³ Institute of Technical Chemistry of the UB of RAS

⁴ Perm State University

Bacterial transformation of plant and animal sterols using the genus *Rhodococcus* actinobacteria in order to obtain pharmacologically active compounds was studied. It was found that members of *Rhodococcus erythropolis*, growing in the presence of n-hexadecane and palmitic acid, efficiently (up to 99%) transform β-sitosterol in high (2-10 g/l) concentrations to pharmacologically active stigmast-4-en-3-one. The biotransformation of 10 g/l β-sitosterol was studied in a bioreactor. The level of stigmast-4-en-3-one formation achieves 40% after 22 days from the start of the experiment. The ability of the rhodococci cells immobilized on technical polymeric tissue to biotransformation of β-sitosterol under alkaline phosphate buffer (pH 7) was studied. *R. erythropolis* IEGM 487 strain, catalyzing under these conditions the most effective (50%) transformation of the starting substrate to stigmast-4-ene-3-one, was selected. The level of the target product formation depends on the number of carrier units with fixed bacteria (1 cm² tissue fragments). Comparative studies of sterol biotransformation with a saturated carbon skeleton in the presence of n-hexadecane or glucose were

conducted. The ability of thermophilic Rhodococcus to oxidize 5 α -cholestane-3 β -ol to 5 α -cholestane-3-one was found for the first time. R. erythropolis IEGM 490, IEGM 766, IEGM 1017 and IEGM 1018 strains, exhibiting a high (87-100%) transforming activity towards 5 α -cholestane-3 β -ol regardless of the source of carbon, were selected.

Keywords: biotransformation, Rhodococcus, immobilisation, sterols, β -sitosterol, stigmasterol, 5 α -cholestane-3-one, 5 α -cholestane-3 β -ol, 5 α -cholestane-3-one, pharmacologically active compounds.

Сведения об авторах

Ноговицина Екатерина Михайловна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: nogov81@list.ru

Бажутин Григорий Андреевич, магистр первого года обучения естественнонаучного факультета, Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет (ПГГПУ), 614990, г. Пермь, ул. Сибирская, 24; e-mail: sniffedbybadger@gmail.com

Гришко Виктория Викторовна, кандидат химических наук, заведующая лабораторией биологически активных соединений, Институт технической химии УрО РАН (ИТХ УрО РАН), 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3; e-mail: grishvic@gmail.com

Елькин Андрей Анатольевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: an220@mail.ru

Тарасова Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: ekaterina.tarasova.87@mail.ru

Кылосова Татьяна Ивановна, аспирант биологического факультета, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: tat-kylosova@yandex.ru

Черемных Ксения Михайловна, аспирант лаборатории алканотрофных микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: kseniya.cheremnikh@gmail.com

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.