

УДК 57.088.6+577.175.62

## ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРОВ ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК РОДОКОККОВ НА ПРОЦЕСС БИОКОНВЕРСИИ $\beta$ -СИТОСТЕРОЛА

Е.М. Ноговицина<sup>а</sup>, В.В. Гришко<sup>б</sup>, И.Б. Ившина<sup>а,с</sup>

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

<sup>б</sup>Институт технической химии УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 3

<sup>с</sup>Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Исследована возможность индукции холестеролоксидазной активности родококков в отношении  $\beta$ -ситостерола. Показано, что холестеролоксидазная реакция более эффективно катализируется родококками в присутствии алифатических кислот, что приводит к увеличению степени образования стигмаст-4-ен-3-она из  $\beta$ -ситостерола. Так, в присутствии пальмитиновой кислоты родококки катализируют образование стигмаст-4-ен-3-она до 55 %.

Для получения оксигенированных стеролов и андростановых производных на основе доступных стероидных спиртов растительного, животного и микробного происхождения наиболее перспективно использование интактных клеток микроорганизмов, катализирующих реакции окисления с высокой степенью регио- и стереоселективности. В настоящее время выделены и охарактеризованы ферменты микроорганизмов, ответственные за синтез ключевых продуктов процесса биотрансформации стеролов. На первом этапе окислительной трансформации стеролов с помощью бактериальных клеток образуются 4-ен-3-оновые производные (рис. 1), синтез которых катализируется бифункциональным ферментом - холестеролоксидазой (Toyama et al., 2002). На основе данной реакции разработан ферментативный метод диагностики уровня холестерина в биологических жидкостях и современные технологии переработки холестеролсодержащего сырья в диетические продукты посредством превращения холестерина в холест-4-ен-3-он (MacLachlan et al., 2000). Обоснована возможность использования стигмаст-4-ен-3-она, образующегося при окислении холестеролоксидазой растительного  $\beta$ -ситостерола, в качестве лекарственного средства при лечении эндокринных заболеваний (Streber, 1993).

Ранее нами было установлено, что родококки, обладающие способностью трансформировать широкий спектр труднодоступных для других микроорганизмов органических субстратов, являются эффективными катализаторами процесса биоконверсии  $\beta$ -ситостерола. Определены оптимальные условия процесса биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он клетками родококков, предполагающие использование изо-

пропанола в качестве растворителя данного стерола, ростового субстрата *n*-гексадекана и представителей *R. ruber* как наиболее эффективных биокатализаторов процесса конверсии  $\beta$ -ситостерола (Ившина и др., 2005; Ноговицины и др., 2007).

Цель настоящей работы – поиск новых альтернативных методов повышения эффективности процесса биоконверсии  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он клетками родококков.

### Материалы и методы

В работе использовали штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 487 и *R. ruber* ИЭГМ 233 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (Каталог ..., 1994; <http://www.iegm.ru/iegmcol/>). Клетки родококков выращивали в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальных шейкерах (150 об/мин) при температуре 28°C. Базовый состав минеральной среды включал следующие компоненты (г/л): KNO<sub>3</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 1,0; NaCl – 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,2; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O – 0,02 (Каталог ..., 1994). В среду добавляли 1 г/л дрожжевого экстракта, 0,1 об.% микроэлементов по Постгейту (Романенко, Кузнецов, 1974). В различных экспериментах  $\beta$ -ситостерол (0,5 г/л) вводили одновременно с внесением культуры или через 1-3 сут роста бактериальных клеток в 5,0 мл изопропанола. В ростовую среду дополнительно вносили 0,79 мМ *n*-декана, *n*-ундекана, *n*-додекана, *n*-гексадекана или *n*-октадекана, а также декановой, ундекановой, лауриновой, тридекановой, пентадекановой, пальмитиновой или стеариновой ки-

слот в 1 мл изопропанола. При проведении экспериментов по биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в соокислительных условиях в качестве ростового субстрата в базовую минеральную среду добавляли 0,1 об. % *n*-гексадекана. В качестве посевного материала использовали родококки ( $5,0 \times 10^5$  клеток/мл), выращенные на мясопептонном агаре и отобранные в экспоненциальной фазе роста.

Продукты бактериального окисления экстрагировали этиловым эфиром уксусной кислоты. Объединенные этилацетатные вытяжки промывали насыщенным водным раствором NaCl, высушивали с помощью обезвоженного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель удаляли в вакууме роторного испарителя. Образование стигмаст-4-ен-3-она контролировали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле с использованием флуоресцентных пластин (Merck, Германия) и ультрафиолетовой лампы КФ-4М (Россия). Экспрессное определение содержания  $\beta$ -ситостерола в культуральной жидкости проводили ферментативным методом (Allain et al., 1974) с детекцией при 500 нм на спектрофотометре Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США). При этом использовали коммерческую тест-систему контроля уровня холестерина (ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург). Количественный анализ продуктов биотрансформации  $\beta$ -ситостерола осуществляли методом УФ-спектроскопии на спектрофотометре Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США). Для определения содержания стигмаст-4-ен-3-она 1 мг пробы растворяли в 1 мл этанола. Величину

абсорбции полученных растворов измеряли при длине волны 240 нм, при расчетах учитывали коэффициент экстинкции целевого продукта ( $\epsilon$ ) –  $12,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kreit et al., 1994).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием компьютерной программы Excel 2003, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку. Все эксперименты проводили в 3 кратной повторяемости.

### Результаты и их обсуждение

На рис. 2. приведены данные исследования динамики образования стигмаст-4-ен-3-она *R. ruber* ИЭГМ 233 в присутствии *n*-гексадекана. Установлено, что максимальная (0,25 г/л) степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигается в условиях добавления стерола через 2 сут от начала эксперимента.

Известно (Halpern, 1981), что в качестве индукторов холестеролоксидазной активности микроорганизмов наряду с *n*-алканами применяются алифатические кислоты в свободном или связанном виде. При исследовании влияния свободных органических кислот на эффективность холестеролоксидазной реакции использовали штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 487, катализирующий в присутствии *n*-алканов образование стигмаст-4-ен-3-она в количестве лишь 7,0-11,6 % (табл. 1).

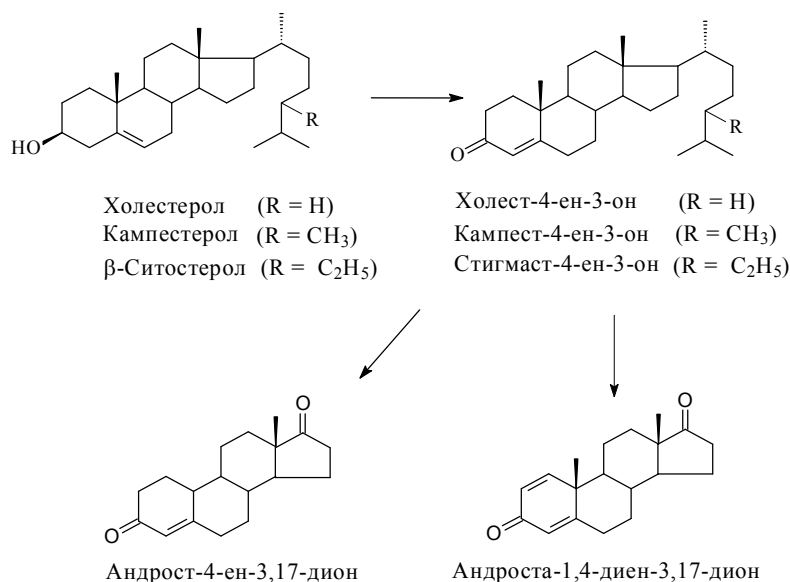


Рис. 1. Основные пути биотрансформации стеролов бактериальными клетками *Mycobacterium* spp.; *Rhodococcus* spp.; *Moraxella* spp. и др. (по. Fernandes et al., 2003)

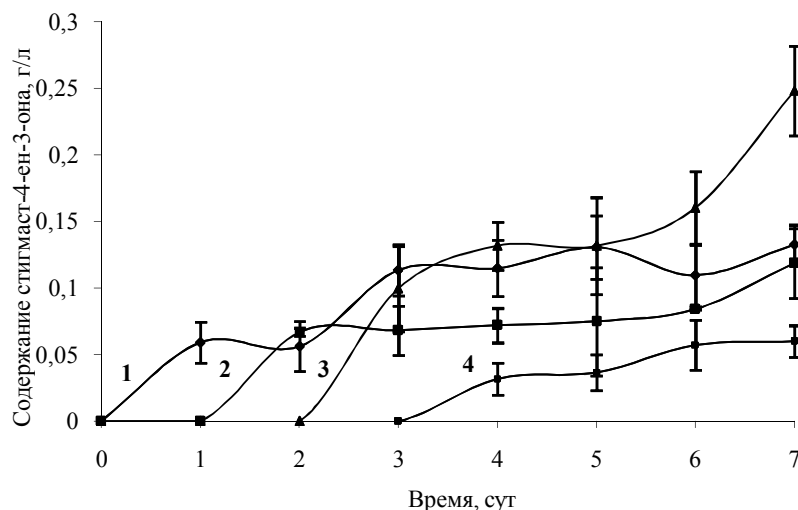


Рис. 2. Динамика образования стигмаст-4-ен-3-она из  $\beta$ -ситостерола клетками *R. ruber* ИЭГМ 233. При добавлении  $\beta$ -ситостерола в среду с *n*-гексадеканом 1 – одновременно с внесением культуры, 2 – через 1 сут роста культуры, 3 – через 2 сут, 4 – через 3 сут.

Таблица 1

**Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола *R. erythropolis* ИЭГМ 487 в присутствии углеводов**

Индуктор	Сумма продуктов реакции, г/л	Содержание в сумме продуктов реакции, г/л	
		$\beta$ -Ситостерола*	Стигмаст-4-ен-3-она
Без добавления индукторов (контроль)	0,55 ± 0,002	0,48 ± 0,001	0,06 ± 0,008 (10,9)**
<i>n</i> -Декан (C <sub>10</sub> )	0,33 ± 0,105	0,25 ± 0,014	0,04 ± 0,006 (11,6)
<i>n</i> -Ундекан (C <sub>11</sub> )	0,44 ± 0,024	0,38 ± 0,006	0,05 ± 0,005 (11,4)
<i>n</i> -Додекан (C <sub>12</sub> )	0,28 ± 0,071	0,22 ± 0,004	0,04 ± 0,004 (11,4)
<i>n</i> -Гексадекан (C <sub>16</sub> )	0,39 ± 0,050	0,28 ± 0,012	0,04 ± 0,007 (10,3)
<i>n</i> -Октадекан (C <sub>18</sub> )	0,46 ± 0,061	0,42 ± 0,001	0,03 ± 0,000 (7,0)

Примечание. \* $\beta$ -Ситостерол добавляли одновременно с внесением культуры. \*\*Здесь и в табл. 2 в скобках приведено процентное содержание стигмаст-4-ен-3-она в сумме продуктов биотрансформации.

При использовании в качестве индукторов алифатических кислот (табл. 2) уровень холестеролоксидазной активности значительно повышается по сравнению с таковым в присутствии *n*-алканов. При этом максимальное количество стигмаст-4-ен-3-она достигается при внесении  $\beta$ -ситостерола в минеральную среду одновременно с инокулятом. Степень образования стигмаст-4-ен-3-она зависит от объема алкильного фрагмента алифатической кислоты, используемой в качестве индуктора. Так, в присутствии кислот с количеством углеродных атомов C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> среди продуктов биотрансформации обнаруживается лишь следовое количество целевого стигмаст-4-ен-3-она. Существенное повышение уровня конверсии  $\beta$ -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он наблюдается в присутствии кислот

C<sub>13</sub>-C<sub>18</sub> (табл. 2), среди которых более эффективно индуцируют холестеролоксидазную реакцию алифатические кислоты с четным числом атомов углерода. При этом максимальная (до 55 %) степень образования стигмаст-4-ен-3-она из  $\beta$ -ситостерола регистрируется при использовании пальмитиновой кислоты (C<sub>16</sub>).

Об особенностях индукции холестеролоксидазной активности родококков в присутствии *n*-алканов или органических кислот судили по результатам сравнительного эксперимента с использованием *n*-гексадекана и пальмитиновой кислоты, имеющих одинаковый алкильный радикал. Обнаружено, что в течение первых 3 сут характер накопления стигмаст-4-ен-3-она в присутствии данных соединений практически не изменяется, затем в

присутствии пальмитиновой кислоты в среде биотрансформации регистрируется резкое увеличение концентрации стигмаст-4-ен-3-она. По-видимому, наличие карбоксильной группы в алифатическом индукторе способствует более эффективному катализу реакции  $\beta$ -окисления, которая, по мнению Халпэна (Halpern, 1981), на генетическом уровне связана с холестеролоксидазной реакцией.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что использование алифатических кислот в качестве индукторов холе-

стеролоксидазной активности позволяет существенно повысить (до 55,3 %) выход стигмаст-4-ен-3-она и сократить в 1,5 раза продолжительность процесса биоконверсии  $\beta$ -ситостерола (с 7 до 5 сут).

Работа поддержана грантами «Ведущие научные школы Российской Федерации» № НШ-4112.2008.4 и грантом междисциплинарного проекта фундаментальных исследований, выполняемых в учреждениях УрО РАН.

Таблица 2

**Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола *R. erythropolis* ИЭГМ 487  
в присутствии алифатических кислот**

Индуктор	Сумма продуктов реакции, г/л	Содержание в сумме продуктов реакции, г/л	
		$\beta$ -Ситостерола	Стигмаст-4-ен-3-она
Без добавления индукторов (контроль)	0,55 ± 0,002	0,48 ± 0,001	0,06 ± 0,008 (10,9)
Декановая кислота (C <sub>10</sub> )	0,41 ± 0,030	0,34 ± 0,035	(<1,0)
Ундекановая кислота (C <sub>11</sub> )	0,31 ± 0,042	0,28 ± 0,012	(<1,0)
Лауриновая кислота (C <sub>12</sub> )	0,46 ± 0,023	0,45 ± 0,004	(<1,0)
Тридекановая (C <sub>13</sub> )	0,23 ± 0,018	0,14 ± 0,043	0,06 ± 0,006 (26,1)
Пентадекановая (C <sub>15</sub> )	0,24 ± 0,060	0,21 ± 0,006	0,02 ± 0,003 (8,3)
Пальмитиновая кислота (C <sub>16</sub> )	0,38 ± 0,019	0,17 ± 0,004	0,21 ± 0,019 (55,3)
Стеариновая кислота (C <sub>18</sub> )	0,38 ± 0,025	0,24 ± 0,004	0,12 ± 0,006 (31,6)

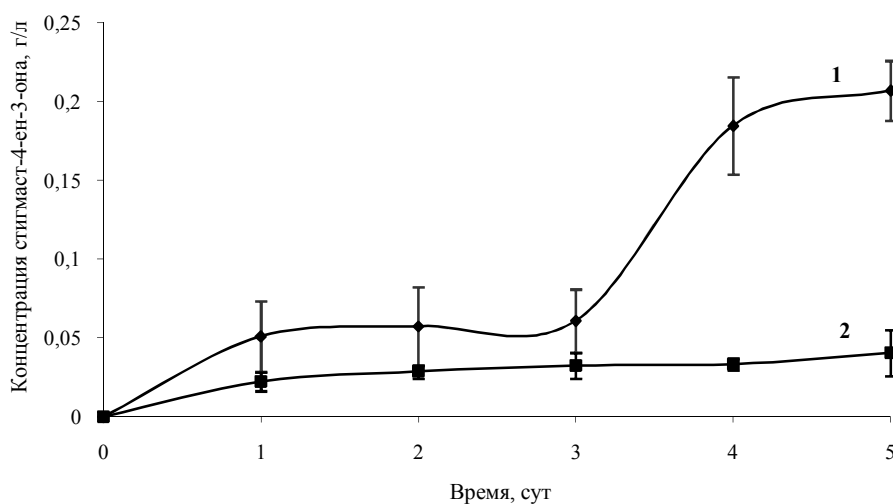


Рис. 3. Динамика образования стигмаст-4-ен-3-она клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 487 при добавлении в качестве индукторов: пальмитиновой кислоты (1) или *n*-гексадекана (2).

**Библиографический список**

- Ившина И.Б.* Биотрансформация  $\beta$ -ситостерола и сложных эфиров  $\beta$ -ситостерола актинобактериями рода *Rhodococcus* / И.Б. Ившина, В.В. Гришко, Е.М. Ноговицина, Т.П. Кукина, Г.А. Толстикова // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41, № 6. С. 626-633.
- Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / под ред. И.Б. Ившиной. М.: Наука, 1994. 163 с.
- Ноговицина Е.М.* Актинобактерии рода *Rhodococcus* как биокатализаторы процесса трансформации  $\beta$ -ситостерола / Е.М. Ноговицина, В.В. Гришко, И.Б. Ившина // Вестник Оренбург. гос. ун-та. 2007. № 75. С. 248-249.
- Романенко В.И.* Экология микроорганизмов пресных водоемов. / В.И. Романенко, С.И. Кузнецов. Л.: Наука, 1974. 194 с.
- Allain C.C.* Enzymatic determination of total serum cholesterol / C.C. Allain, L.S. Poon, C.S.G. Chan, W. Richmond, P.C. Fu // Clin. Chem. 1974. Vol. 20. P. 470-475.
- Fernandes P.* Microbial conversion of steroid compounds: recent developments / P. Fernandes, A. Cruz, B. Angelova, H.M. Pinheiro, J.M.S. Cabral // Enzyme Microb. Technol. 2003. Vol. 32, № 6. P. 688-705.
- Halpern M.G.* Cholesterol oxidase from bacteria. Industrial enzymes from microbial sources / M.G. Halpern // Chem. Technol. Rev. 1981. Vol. 186. P. 3-22.
- Kreit J.* Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus erythropolis*. / J. Kreit, G. Lefebvre, P. Germain // J. Biotechnol. 1994. Vol. 33. P. 271-282.
- MacLachlan J.* Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. / J. MacLachlan, A.T.L. Wotherspoon, R.O. Ansell, C.J.W. Brooks // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2000. Vol. 72. P. 169-195.
- Streber S.* Use stigmasta-4-en-3-one in the treatment of androgen dependent disease / S. Streber. Patent 5264428 USA. 23.11.1993.
- Toyama M.* Alteration of substrate specificity of cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. by site-directed mutagenesis / M. Toyama, M. Yamashita, M. Yoneda, A. Zaborowski, M. Nagato, H. Ono, N. Hirayama, Y. Murooka // Protein Eng. 2002. Vol. 15, № 6. P. 477-484.

**Influence of cholesterol oxidase activity inducers in rhodococci cells on  $\beta$ -sitosterol bioconversion**

Ye.M. Nogovitsina, V.V. Grishko, I.B. Ivshina

Possible induction of cholesterol oxidase activity of rhodococci cells towards  $\beta$ -sitosterol bioconversion was investigated. It was shown that rhodococci more effectively catalyzed cholesterol oxidase reaction in the presence of aliphatic acids; this resulted in the increased levels of stigmast-4-ene-3-one formation from  $\beta$ -sitosterol. Thus, rhodococci cells catalyzed up to 55 % stigmast-4-ene-3-one formation in the presence of palmitic acids.