

УДК 57.088.6+577.175.62

## ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ АЛКАНОТРОФНЫХ РОДОКОККОВ К БИОТРАНСФОРМАЦИИ СТИГМАСТ-5-ЕН-3 $\beta$ -ОЛА

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

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

<sup>б</sup> Институт технической химии УрО РАН, 614000, Пермь, ул. Ленина, 13

<sup>с</sup> Институт органической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9

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

Среди актинобактерий с высокой активностью оксигеназ, хранящихся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ ([www.ecology.psu.ru/iegmc/strains/](http://www.ecology.psu.ru/iegmc/strains/)), выявлены штаммы *Rhodococcus* spp., катализирующие процесс биоконверсии стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола ( $\beta$ -ситостерола) в стигмаст-4-ен-3-он в соокислительных условиях культивирования родококков на минеральной среде с *n*-гексадеканом. Установлено, что клетки родококков в присутствии глюкозы и ингибитора 2,2'-дипиридила трансформируют стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол в 17 $\beta$ -гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон), широко востребованный в фармацевтической практике.

В процессе синтеза интермедиатов стероидных лекарственных препаратов перспективно использование реакций биологической трансформации стероидов растительного и животного происхождения. Стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол ( $\beta$ -ситостерол), выделяемый из отходов деревообрабатывающей промышленности, один из наиболее дешевых и доступных источников стероидов андростанового ряда. Наибольший интерес для получения андрост-4-ен-3,17-диона и андроста-1,4-диен-3,17-диона – предшественников гормональных препаратов – представляют реакции окислительного отщепления алифатической боковой цепи молекулы, окисления 3 $\beta$ -гидроксильной группы в кетогруппу, изомеризации и дегидрогенизации (рис. 1).

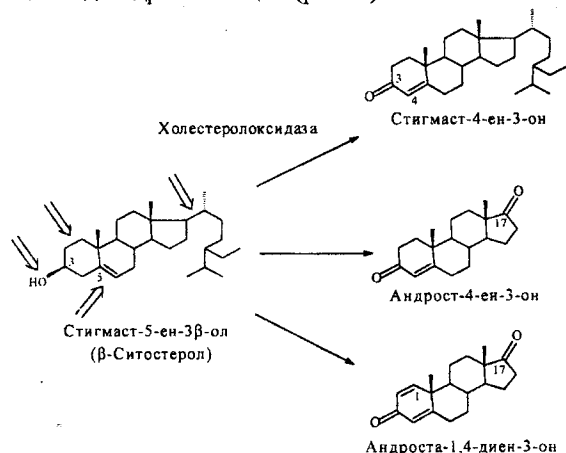


Рис. 1. Возможные пути биотрансформации стероидов

В процессах биотрансформации стероидов успешно используются представители различных групп прокариотных организмов (Seidel, Horhold, 1992; Mahato, Majumdar, 1993; Ambrus et al., 1995; Mahato, Garai, 1997). Актинобактерии рода *Rhodococcus*, характеризующиеся высокой активностью оксигеназ и способностью ассимилировать гидрофобные субстраты, имеют высокий биотехнологический потенциал и рассматриваются в качестве перспективных агентов трансформации органических соединений (Ившина, 1997; Warhurst, Fewson, 1994). В настоящее время известно лишь несколько работ по биоконверсии стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола клетками родококков (Murohisa, Iida, 1993; MacLachlan et al., 2000). В лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН собрана обширная коллекция чистых идентифицированных непатогенных бактериальных культур, выделенных из различных природных субстратов контрастных природно-климатических зон. Значительный удельный вес в общем количестве коллекционных штаммов занимают представители рода *Rhodococcus sensu stricto*.

Цель настоящего исследования – поиск новых активных биотрансформаторов стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола ( $\beta$ -ситостерола) и изучение особенностей процесса биоконверсии данного стероидов с использованием коллекционных культур алканотрофных родококков.

### Объекты и методы исследования

В работе использовали 99 штаммов родококков (табл. 1), принадлежащих видам *R. erythropolis*, *R. "longus"*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* и хранящихся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (Каталог штаммов..., 1994; www.ecology.psu.ru/iegmcollections/strains/).

Таблица 1  
Коллекционные штаммы *Rhodococcus* spp.

Род, вид	Количество штаммов	Номер штамма в коллекции ИЭГМ
<i>R. erythropolis</i>	18	10, 12, 22, 23, 179, 183, 188, 192, 200, 203, 252, 259, 267, 271, 487, 498, 505, 696
<i>R. "longus"</i>	4	28, 32, 68, 69
<i>R. opacus</i>	3	246, 261, 489
<i>R. rhodochrous</i>	3	64, 647, 655
<i>R. ruber</i>	71	71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 172, 219, 220, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 331, 333, 346, 381, 457, 467, 468, 474, 478, 577, 583, 593, 597

Культуры выращивали в жидкой минеральной среде (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3$  – 0,001; дрожжевой экстракт – 0,1, содержащей 0,1 об. % *n*-гексадекана, 1,0 % глицерина или 1,0 % глюкозы. Стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол (500 мг/л) предварительно растворяли в пропан-2-оле и добавляли в минеральную среду через 48 ч культивирования бактериальных клеток. В экспериментах по ингибированию 9 $\alpha$ -гидроксилазной активности одновременно с стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -олом в качестве ингибитора вносили 2,2'-дипиридил (70 мг/л). Культивирование родококков проводили на орбитальном шейкере (150 об/мин) при температуре 28°C. Посевным материалом служили родококки ( $5 \times 10^5$  кл/мл), выращенные на мясопептонном агаре и отобранные в экспоненциальной фазе роста. Содержание белка определяли с использованием модифицированного метода Лоури (Горина, Яковлева, 1980). Количество остаточного стерина в культуральной жидкости выявляли ферментативным экспресс-методом (Allain et al., 1974) с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin Elmer) и коммерческой тест-системы контроля уровня холестерина (ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург).

Продукты микробного окисления экстрагировали этиловым эфиром уксусной кислоты (3  $\times$  50

мл). Объединенные этилацетатные вытяжки сушили над обезвоженным сульфатом натрия. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя. Образование продуктов бактериального окисления контролировали методом тонкослойной хроматографии на Sigma-Aldrich TCX пластинах. Образование стигмаст-4-ен-3-она регистрировали в УФ-лучах, остальных интермедиатов – опрыскиванием  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (конц.) и последующим прогреванием при 95-100°C в течение 4-6 мин. При анализе реакционных смесей в качестве эталонного соединения использовали химически чистый стигмаст-4-ен-3-он, который получали путем окисления стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола хромовой смесью. Количественный состав продуктов окисления анализировали с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Милихром (колонка 6,3 $\times$ 0,2 см с фазой Lichrosorb RP-18). В качестве элюента использовали метанол, дегазированный путем продувки гелия, в качестве растворителя для нанесения пробы на колонку – смесь ацетона с метанолом (3:1); рабочая длина волны прибора – 210 нм. Содержание стигмаст-4-ен-3-она в сумме стеринных компонентов определяли по площадям пиков хроматограмм реакционных смесей с учетом коэффициентов, обусловленных разницей в экстинкции исходного и конечного продукта. Данные коэффициенты рассчитывали при использовании искусственных смесей стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола и стигмаст-4-ен-3-она. Качественный анализ продуктов биотрансформации проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973N в качестве детектора и кварцевой колонкой HP-5MS SN US 15189741-1.

Для статистической обработки результатов использовали компьютерные программы Microsoft Excel.

### Результаты и их обсуждение

Экспериментами установлено, что все исследуемые штаммы родококков используют стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом уровень деструкции исходного субстрата незначителен и не превышает 20%.

Нами был отобран штамм *R. ruber* ИЭГМ 233 (табл. 2), трансформирующий стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол до стигмаст-4-ен-3-она (7,9%), образование которого катализируется бифункциональным ферментом – холестеролоксидазой, ответственным за реакции окисления 3 $\beta$ -гидроксильной группы и изомеризации двойной связи. С целью повышения степени конверсии стерина данный штамм выращивали в соокислительных условиях с использованием глицерина, глюкозы или *n*-гексадекана. По нашим данным, максимальное (68,59 мкг/мл) накопление клеточного белка наблюдается при выращивании *R. ruber* ИЭГМ 233 в условиях соокисления с глюкозой, в остальных слу-

чаях содержание белка не превышает 20,83-27,95 мкг/мл (рис. 2).

Таблица 2  
Биотрансформация стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола клетками *Rhodococcus* spp.

Вид, штамм	Сумма продуктов реакции, мг/л	Содержание в сумме продуктов реакции, мг/л	
		Стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол	Стигмаст-4-ен-3-он
Абиотический контроль	460,70	460,70	Не обнаружено
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 22	443,42	421,64	(<1)
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 23	468,12	461,45	(<1)
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 179	441,52	415,83	15,69 (3,6)
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 183	439,21	411,18	17,45 (4,0)
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 77	428,63	397,62	9,08 (2,1)
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 80	451,28	449,43	(<1)
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 233	365,57	308,83	28,84 (7,9)
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 322	450,27	443,87	(<1)

Примечание. Здесь и в табл. 3 в скобках приведено количество стигмаст-4-ен-3-она в процентах.

Как видно из табл. 3, родококки осуществляют биотрансформацию стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола наиболее активно в условиях соокислительного роста в присутствии *n*-гексадекана. При этом в качестве основного

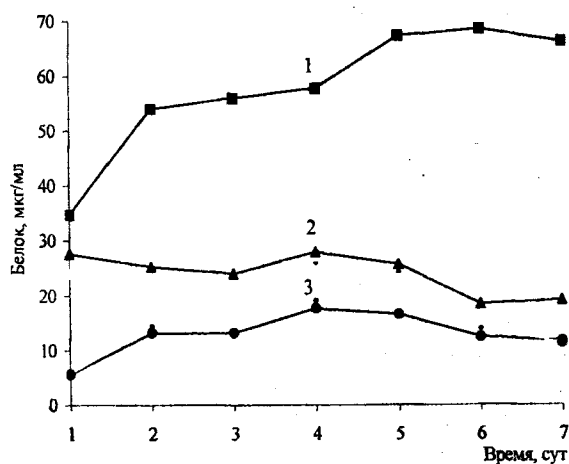


Рис. 2. Содержание клеточного белка *R. ruber* ИЭГМ 233 при росте в среде с стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -олом в присутствии: 1 – глюкозы, 2 – *n*-гексадекана, 3 – глицерина

продукта биотрансформации накапливается значительное (310,5 мг/л) количество стигмаст-4-ен-3-она – общая сумма продуктов реакции составляет 376,65 мг/л. В связи с этим все эксперименты по изучению трансформирующей активности родококков в дальнейшем проводили в соокислительных условиях с ис-

пользованием *n*-гексадекана. На рис. 3 представлены хроматограммы продуктов биотрансформации стерина клетками *Rhodococcus* spp., полученные с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Большинство исследуемых штаммов родококков в условиях соокисления с *n*-гексадеканом трансформируют стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол до стигмаст-4-ен-3-она, содержание которого в сумме продуктов биотрансформации у наиболее активных бактериальных культур составляет от 40,0 до 98,0%. Как видно из табл. 4, представители *R. ruber* характеризуются наиболее выраженной холестеролоксидазной активностью в отношении стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола и катализируют процесс биоконверсии стерина до образования стигмаст-4-ен-3-она.

Таблица 3  
Биотрансформация стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 233

Источник углерода	Сумма продуктов реакции, мг/л	Содержание в сумме продуктов реакции, мг/л	
		Стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол	Стигмаст-4-ен-3-он
$\beta$ -Ситостерол	365,57	308,83	28,84 (7,9)
<i>n</i> -Гексадекан	376,65	10,75	310,50 (82,4)
Глицерин	248,23	167,47	60,35 (24,3)
Глюкоза	152,42	59,44	83,25 (54,6)

Таблица 4  
Биотрансформация стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола клетками *Rhodococcus* spp. в присутствии *n*-гексадекана

Вид, штамм (число штаммов)	Количество стигмаст-4-ен-3-она, %
Абиотический контроль	0
<i>R. erythropolis</i> (7)	4,7-27,1
<i>R. erythropolis</i> (10)	41,0-57,1
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 10	70,7
<i>R. "longus"</i> (4)	2,2-8,0
<i>R. opacus</i> (3)	2,9-6,3
<i>R. rhodochrous</i> (3)	0-14,4
<i>R. ruber</i> (27)	4,6-27,4
<i>R. ruber</i> (13)	33,9-47,3
<i>R. ruber</i> (22)	51,2-78,4
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 219	80,0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 233	82,4
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 235	90,6
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 94	92,7
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 72, ИЭГМ 85, ИЭГМ 86, ИЭГМ 172, ИЭГМ 220	98,0

Необходимо отметить, что во всех экспериментах был получен низкий уровень продуктов отщепления боковой цепи  $\beta$ -ситостерола, содержание которых не превышало 2%. С учетом результатов определения способности родококков к более полной деградации стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола (табл. 3) и максимального накопления клеточной биомассы в условиях соокисления с глюкозой (рис. 2)

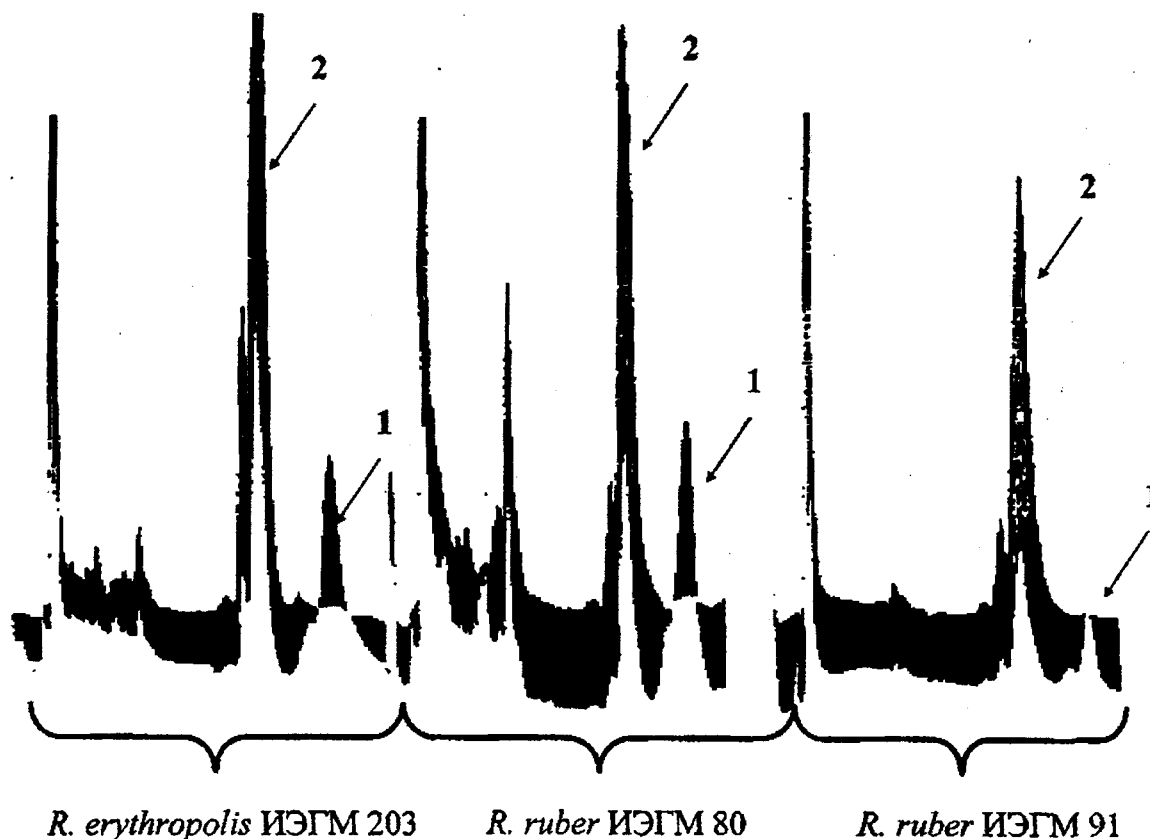
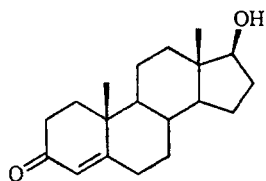


Рис. 3. Хроматограммы продуктов биотрансформации стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола клетками *Rhodococcus* spp. в соокислительных условиях в присутствии *n*-гексадекана:  
1 – остаточный стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол; 2 – стигмаст-4-ен-3-он

последующие скрининговые исследования проводили в условиях ингибирования активности фермента 9 $\alpha$ -гидроксилазы, катализирующего начальную стадию деструкции циклического остова молекулы стерина. По данным хромато-масс-спектрометрии, в присутствии глюкозы и ингибитора 2,2'-дипиридила с использованием клеток родококков достигается отщепление боковой алифатической цепи стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ола с образованием 10% 17 $\beta$ -гидроксиандроста-4-ен-3-она (тестостерона). Необходимо отметить, что в литературе описана способность лишь некоторых прокариотных организмов, в частности микобактерий, к одностадийной трансформации стерина до образования тестостерона (Hung et al., 1994; Lo et al., 2002).



17 $\beta$ -Гидроксиандрост-4-ен-3-он  
(тестостерон)

Таким образом, нами установлено, что большинство исследованных коллекционных штаммов

*Rhodococcus* spp. в соокислительных условиях с *n*-гексадеканом трансформирует стигмаст-5-ен-3 $\beta$ -ол в стигмаст-4-ен-3-он. При этом представители *R. ruber* характеризуются выраженной холестеролоксидазной активностью по отношению к исходному стерину. Обнаружено, что родококки в соокислительных условиях с глюкозой в присутствии ингибитора 2,2'-дипиридила катализируют реакцию отщепления боковой алифатической цепи  $\beta$ -ситостерола с образованием целевого продукта 17 $\beta$ -гидроксиандроста-4-ен-3-она (тестостерона).

Работа поддержана грантами ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России на 2002-2006 годы» (проект № И0573/1343), РФФИ (№ 01-04-96461).

#### Библиографический список

- Горина И.А., Яковлева В.И. Быстрый метод определения содержания белка в клетках микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1980. Т. 16, № 6. С. 936-937.
- Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: биоразнообразие, детекция, иммунодиагностика: Дис... д-ра биол. наук. Пермь, 1997.

- Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И.Б. Ившиной М.: Наука, 1994.
- Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W., Fu P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol // *Clin. Chem.* 1974. Vol. 20, № 4. P. 470-475.
- Ambrus G., Ilkoy E., Jekkel A., Horvath G., Böcskei Z. Microbial transformation of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol into 26-oxygenated derivatives // *Steroids*. 1995. Vol. 60, № 6. P. 621-625.
- Hung B.R., Falero A., Lanes N., Perez S., Ramirez M.A. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. // *Biotechnol. Lett.* 1994. Vol. 16, № 5. P. 497-500.
- Lo C.K., Pan C.P., Liu W.H. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by mutant of *Mycobacterium* sp. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 28, № 5. P. 280-283.
- MacLachlan J., Wotherspoon A.T.L., Ansell R.O., Brooks, C.J.W. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications // *J. Ster. Biochem. Mol. Biolog.* 2000. Vol. 72, № 5. P. 169-195.
- Mahato S.B., Garai S. Advances in microbial steroid biotransformation // *Steroids*. 1997. Vol. 62, № 4. P. 332-345.
- Mahato S.B., Majumdar I. Current trends in microbial steroid biotransformation // *Phytochemistry*. 1993. Vol. 34, № 4. P. 883-898.
- Murohisa T., Iida M. Studies on microbial transformation (XXVI). Some new intermediates in microbial side chain degradation // *J. Ferment. Bioeng.* 1993. Vol. 75, № 3. P. 174-180.
- Seidel L., Hoerhold C. Selection and characterization of new microorganisms for the manufacture of 9-OH-AD from sterol // *J. Basic. Microbiol.* 1992. Vol. 32, № 1. P. 49-55.
- Warhurst A.M., Fewson A.C. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 1994. Vol. 14, № 1. P. 29-73.

### The study of alkanotrophic rhodococci ability to biotransform stigmast-5-en-3-ol

Ye.M. Nogovitsina, V.V. Grishko, T.P. Kukina and I.B. Ivshina

Amongst actinobacteria possessing high oxygenase activities and stored in the Regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms IEGM ([www.ecology.psu.ru/iegmcol/strains/](http://www.ecology.psu.ru/iegmcol/strains/)), there were identified *Rhodococcus* spp. strains catalysing process of bioconversion of stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) to stigmast-4-en-3-one under cooxidative cultivation of rhodococci on mineral salts medium supplemented with *n*-hexadecane. In the presence of glucose and the inhibitor 2,2'-dipyridil, rhodococci cells were determined to convert stigmast-5-en-3 $\beta$ -ol to 17 $\beta$ -hydroxyandrost-4-en-3-one (testosterone), with the latter being widely used for pharmaceutical purposes.