

На правах рукописи

Лучникова Наталья Алексеевна

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ
ОЛЕАНАНОВОГО РЯДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИНОМИЦЕТОВ
РОДА *RHODOCOCCUS***

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и лаборатории алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь

Научный руководитель:

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Официальные оппоненты:

Несчисляев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО «НПО Микроген» в г. Перми Пермское НПО «Биомед»

Михайлов Валерий Викторович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, куратор Коллекции морских микроорганизмов, зав. лабораторией микробиологии Тихоокеанского института биоорганической химии имени Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Защита состоится « 15 » декабря 2023 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского по адресу: 117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На фоне дефицита высокоэффективных фармакологических средств для лечения социально значимых заболеваний актуальной задачей является синтез новых химических соединений с биологической активностью на основе растительных пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда, в том числе олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот (Calixto, 2019; Kumar, Dubey, 2019). Данные тритерпеновые кислоты используются для получения производных с выраженной противовирусной, антимикробной, противовоспалительной, противоопухолевой и гепатопротекторной активностью (Huang *et al.*, 2014; Wiemann *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2017). В настоящее время трансформация тритерпеноидов с образованием новых производных в основном осуществляется с использованием химических методов, которые реализуются в условиях экстремальных показателей кислотности, температуры и часто требуют применения дорогостоящих катализаторов или введения защитных групп реакционно-активных центров молекулы (Alho *et al.*, 2019).

Наряду с химической модификацией, предпринимаются попытки биологической трансформации ОК и ГК с использованием микроорганизмов. Это обусловлено исключительной хемо- и стереоселективностью катализируемых реакций, отсутствием необходимости в защите реакционно-активных центров молекулы, а также, что немаловажно, устойчивой активностью микроорганизмов в экстремальных условиях среды. Подавляющая часть описанных на сегодня процессов биотрансформации ОК и ГК осуществляется с использованием грибов и сопровождается образованием гидрокси-, оксо- и гликозидных производных (Capel *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018). Однако эти процессы характеризуются сравнительно низким (от 2,6 до 43,2%) уровнем биоконверсии субстрата, технологически нецелесообразны вследствие мицелиального характера роста грибов и потенциально могут представлять опасность из-за способности их к выработке микотоксинов с выраженным мутагенным и канцерогенным действием. Примеры бактериальной трансформации ОК и ГК единичны и включают процессы, катализируемые представителями родов *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, среди которых немало штаммов с выраженными патогенными свойствами. При этом описанные бактерии проявляют каталитическую активность в отношении сравнительно невысоких (до 0,3 г/л) концентраций тритерпеноидов (Ludwig *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2020).

В связи с этим актуален поиск новых бактериальных катализаторов направленной трансформации ОК и ГК. Одной из активно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные актиномицеты экологически значимых видов, характеризующиеся наибольшим разнообразием трансформируемых сложных по структуре гидрофобных субстратов (Ivshina *et al.*, 2017). Типично бактериальный характер роста и лабильность метаболической системы, в том числе в экстремальных условиях внешней среды, обуславливают перспективность использования актиномицетов для биотрансформации ОК и ГК. Способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к направленной биоконверсии пентациклических тритерпеноидов ранее была показана на примере бетулина с образованием биологически активного бетулона (Grishko *et al.*, 2013).

Цель настоящей работы – оценка способности коллекционных штаммов актиномицетов к окислительной трансформации пентациклических тритерпеноидов

олеананового ряда на примере ОК и ГК для получения новых фармакологически активных соединений.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать каталитическую активность коллекционных штаммов актиномицетов в отношении ОК и ГК. Отобрать эффективные биотрансформаторы ОК и ГК.

2. Выявить механизмы взаимодействия бактериальных клеток с тритерпеновыми субстратами.

3. Определить оптимальные условия процесса окислительной биотрансформации ОК и ГК с целью максимального выхода целевых продуктов.

4. Идентифицировать основные метаболиты ОК и ГК и оценить их биологическую активность.

5. Определить локализацию ферментных систем, участвующих в процессе окислительной биотрансформации тритерпеноидов. Исследовать функциональную характеристику генов, кодирующих ферменты метаболизма ОК и ГК.

Научная новизна. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmcsl.ru>) впервые установлена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда – ОК и ГК. Выявлены наиболее типичные адаптивные реакции родококков на присутствие тритерпеновых кислот – от изменения морфометрических показателей и рельефа бактериальных клеток до образования в результате адгезии многоклеточных агрегатов, а также синтеза и аккумуляции резервных энергетических веществ. Использование суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* обеспечивает полную биоконверсию ОК и ГК в высоких (1,0 г/л) концентрациях. Полученные метаболиты ОК и ГК идентифицированы как 3-оксопроизводные. При использовании клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 документированы новые реакции C5 гидроксирования и C23 карбоксилирования молекулы ОК с образованием ранее неопisanного полиоксигенированного метаболита – 3 β ,5 α ,22 α -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой) кислоты. По данным *in silico* анализа, полученные метаболиты обладают пониженной токсичностью по сравнению с исходными кислотами и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов. Способом *in vitro* обнаружена антибактериальная активность полученных метаболитов – 3-оксо-ОК и 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты. С использованием биоинформатического анализа результатов NGS-секвенирования штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* и последующей постановки ПЦР в реальном времени выявлены гены, ответственные за образование ферментов семейства CYP450, участвующих в процессе биоконверсии тритерпеноидов.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения расширяют представление о биокаталитическом потенциале родококков и возможности их использования в качестве перспективных биопродукторов новых фармакологически активных соединений на основе растительных пентациклических тритерпеноидов. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, ИЭГМ 1360, характеризующиеся высокой каталитической активностью в отношении ОК и ГК. Получены метаболиты, идентифицированные как 3-оксопроизводные ОК и ГК.

Обнаружен ранее неизвестный метаболит – 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновая кислота. Рентгеноструктурные данные ранее неопищенного производного размещены в Кембриджском центре кристаллографических данных (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>) под номером CCDC 2211937. Экспериментально подтверждено участие мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе окислительной биотрансформации ОК и ГК. Составлен Каталог функциональных генов биоконверсии ОК и ГК. Сведения о полных геномах *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (JAJNCO000000000.1), ИЭГМ 1360 (JAJNCN000000000.1) внесены в международную базу данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 по форме «патентное депонирование» переданы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номерами Ас-2189 и Ас-2191 соответственно. Подана заявка 2023111046/10(023624) от 28.04.2023 на выдачу патента РФ «Способ получения 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*». Результаты исследования используются в учебных курсах «Биоразнообразие и систематика микроорганизмов» и «Введение в биотехнологию» для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штаммах-биотрансформаторах тритерпеновых кислот внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegmc.ru/strains>).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Актиномицеты рода *Rhodococcus* используют ОК и ГК в качестве единственного источника углерода и энергии. Наибольшую трансформирующую активность проявляют штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, катализирующие биоконверсию тритерпеноидов в концентрации 1,0 г/л в течение 5 сут.

2. Наиболее типичные реакции родококков на присутствие тритерпеновых кислот (ОК, ГК) – изменение морфометрических показателей бактериальных клеток, степени их шероховатости, усиление гидрофобных взаимодействий между клетками, адгезия, переход от одноклеточного к агрегированному состоянию, сверхсинтез и аккумуляция резервных энергетических веществ (липиды, полифосфаты).

3. Максимальный выход целевых продуктов окисления ОК и ГК обеспечивает использование суспензий (ОП₆₀₀ 2,0–2,6) нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 при значениях pH 8,0 и 6,0 соответственно.

4. Основные метаболиты ОК и ГК – 3-оксопроизводные. Биотрансформация ОК сопровождается образованием дополнительной ранее неопищенной 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты. Выявленные метаболиты характеризуются антибактериальной активностью, по данным *in silico*, менее токсичны по сравнению с ОК и ГК и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов.

5. В процессе биотрансформации ОК и ГК участвуют мембранно-связанные ферменты, в том числе принадлежащие к семейству CYP450. Составленный Каталог генов, кодирующих ферменты окислительной трансформации ОК и ГК, пригоден для поиска целевых генов.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на World Summit on Catalysis Engineering and Technology (CatET-2019), Valencia, Spain, 2019; XI Всероссийском конгрессе молодых

ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия», Пермь, 2019; VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Ялта, 2020; Всероссийской междисциплинарной молодежной научной конференции с международным участием «IX Информационная школа молодого ученого», Екатеринбург, 2021; Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования», Пермь, 2021; Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов», Владивосток, 2022.

По теме диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз, а также 1 патент.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 58 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 210 наименований работ, в том числе 9 отечественных и 201 зарубежных.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (Соглашение № 075.15-2021-1051) и Госзаданий Минобрнауки РФ (АААА-А19-119112290008-4, АААА-А20-120081990069-3, 122010800029-1), поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (Аспиранты, № 20-34-90104). Научные положения и выводы работы базируются на результатах собственных исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Исследования с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, а также энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с картированием элементов проводили на базе центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.). Идентификацию продуктов трансформации методами ГХ-МС и ЯМР, а также оценку цитотоксической активности осуществляли на базе лаборатории биологически активных соединений «Института технической химии УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН (зав. лаб. – к.х.н. Гришко В.В.); идентификацию нового метаболита с использованием метода РСА – на базе кафедры органической химии Пермского государственного национального исследовательского университета (зав. каф. – д.х.н., проф. Масливец А.Н.).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция бактериальных культур. В работе использовали 148 штаммов актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; номер во Всемирной федерации коллекций культур 285, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmc.ru>), которые представлены следующими видами: *Brevibacterium* sp. (3 штамма), *Corynebacterium ammoniagenes* (1 штамм), *C. glutamicum* (1 штамм), *Glutamicibacter nicotinas* (1 штамм), *Gordonia terrae* (4 штамма), *Micrococcus luteus* (2 штамма), *M. lylae* (1 штамм), *Micrococcus* sp. (2 штамма), *Paeniglutamicibacter sulfureus* (1 штамм), *Rhodococcus aetherivorans* (1 штамм), *R. cercidiphylli* (1 штамм), *R. erythropolis* (32 штамма), *R. fascians* (19 штаммов), *R. jostii* (3 штамма), *R. koreensis* (1 штамм), *R. opacus* (15 штаммов), *R. qingshengii* (2 штамма), *R. rhodochrous* (27 штаммов) и *R. ruber* (31 штамм).

Условия культивирования. Биотрансформацию ОК и ГК проводили в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Certomat IS (Sartorius, Германия) при 160 об/мин и температуре 28°C в минеральной среде К следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,02; $FeCl_3$ – 0,001 с добавлением микроэлементов по Постгейту (0,1 об.%). Бактериальные клетки, выращенные в течение 2-х сут на мясопептонном агаре (HiMedia, Индия), ресуспендировали в 0,5% р-ре NaCl в соответствии со стандартом мутности БАК-5 (Ормет, Россия) и вносили в среду культивирования в концентрации 1,0 об.%. ОК (Acros Organics, США) и ГК (TCI, Бельгия) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мг:10 мкл) и вносили в концентрации 1,0 г/л. В качестве биотического контроля использовали инокулированную среду с дрожжевым экстрактом (0,1 г/л) без добавления ОК или ГК, в качестве абиотического контроля – стерильные растворы ОК и ГК в минеральной среде.

Иммобилизация бактериальных клеток. В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации использовали техническую ткань из нитей СВМ арт. 56313Н ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88 (ООО УкрматериалИнвест, Украина) и полипропиленовые диски PP 5-10SL (Wuhu Ecotech Trade Co, Китай). Иммобилизацию проводили в течение 3 сут в условиях постоянного перемешивания (130 об/мин, 28°C) в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл бактериальной суспензии (ОП₆₀₀ 1,0) в фосфатном буфере (рН 7,0) и 10 образцов технической ткани ($S = 1 \text{ см}^2$) или 200 полипропиленовых дисков ($d = 0,5 \text{ мм}$), неадсорбированные клетки отмывали фосфатным буфером (рН 7,0).

Получение суспензий нерастаущих клеток. Родококки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 48 ч. Бактериальные клетки после достижения стационарной фазы роста осаждали центрифугированием (3000 об/мин) в течение 10 мин и трижды отмывали эквивалентным объемом фосфатно-щелочного буфера (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 25 мл фосфатно-щелочного буфера (рН 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) и доводили оптическую плотность до ОП₆₀₀ 2,0; 2,2; 2,4; 2,6; 2,8 (спектрофотометр Lambda EZ201, Perkin Elmer, США). Дополнительно оценивали концентрацию клеток (г/л) путем подсчета веса сухой биомассы.

Получение отдельных клеточных фракций осуществляли по (Tarasova *et al.*, 2017). В работе использовали супернатант с цитоплазматическими ферментами, супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами

и ресуспендированный соникат с неэкстрагируемыми мембранно-связанными ферментами.

Жизнеспособность бактериальных клеток определяли специфическим окрашиванием йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США) или двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США).

Детекцию внутриклеточных липидных включений проводили путем окрашивания клеток красителем Nile Red в ДМСО по (Mrunalini, Girisha, 2017).

Определение электрокинетического потенциала. Бактериальные клетки, предварительно выращенные в присутствии, а также без ОК и ГК, отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO₃ до ОП₆₀₀ 0,2. Измерение электрокинетического (ζ) потенциала проводили с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Микроскопические исследования. *Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия.* Визуализацию и измерение размеров осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия), оснащенного фотокамерой AxioCam 506 Color и флуоресцентным источником света HXP 120 V (Zeiss, Германия), в режиме фазового контраста или флуоресценции (светофильтры FS 106) с увеличением $\times 1000$.

Атомно-силовая (АСМ) и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Использовали систему совмещенного сканирования, состоящую из атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония).

Сканирующая (СЭМ) и просвечивающая (ПЭМ) электронная микроскопия. Ультратонкие срезы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), целые клетки – в сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) с картированием элементов. Использовали микроскоп JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенный системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания). ЭДС-спектры и элементные карты получали с помощью программы AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

Респираторная активность. Оценку скорости (мкл/ч) поглощения кислорода и выделения углекислого газа и их общего количества (мкл) осуществляли с использованием высокочувствительного 10-канального респирометра непрямого цикла MicroOxymax[®] (Columbus Instruments, США).

Полногеномное секвенирование штаммов родококков проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора Illumina NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes v. 3.14.1.

Биоинформатический анализ. Поиск функциональных генов, кодирующих ферменты семейства CYP450, проводили в международной базе данных NCBI на основе автоматически аннотированных полных геномов штаммов *Rhodococcus* spp. Подбор пар праймеров и сравнение последовательностей целевых генов проводили с использованием сервисов Primer-BLAST и BLASTN, доступных на сайте NCBI; поиск биосинтетических генных кластеров – онлайн-сервисов AntiSMASH (<http://www.antismash.secondarymetabolites.org>) (Skinnider *et al.*, 2020) и PRISM

(<http://www.prism.adapsyn.com>) (Blin *et al.*, 2021); анализ аминокислотных последовательностей и построение метаболических путей – базы данных KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) и сервисов GhostKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016) и RAST (Brettin *et al.*, 2015).

Молекулярно-генетический анализ. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили согласно протоколу процесса выделения ДНК с помощью стандартного набора (Евроген, Россия), постановку ПЦР – с использованием амплификатора Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США). Положительным контролем служили видоспецифические праймеры на основе гена 16S рНК к *R. rhodochrous*. Детектирование продуктов ПЦР и определение их размеров проводили при помощи системы гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Количественный и качественный анализ ОК, ГК и их метаболитов. Для экстракции остаточных ОК, ГК и продуктов их биотрансформации постферментационную среду подкисляли 10% р-ром HCl до pH 3,0–4,0 и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1% р-ром Na₂CO₃ и дистиллированной водой (до pH 7,0). Полученный этилацетатный экстракт обезвоживали над Na₂SO₄. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (Heidolph, Германия). Качественную оценку этилацетатных экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-гексан:этилацетат (1:1 или 4:1) на пластинах Alugram® Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel, Германия). Детекцию соединений проводили путем облучения ультрафиолетом ($\lambda = 254$ нм) или обработки пластины 15% H₂SO₄ и последующим нагреванием (100–120°C, 2–3 мин).

Качественный анализ экстрактов и оценку динамики образования продукта трансформации ГК проводили с использованием газового хромото-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890B/5977B (Agilent Technology, США) и капиллярной колонки HP-5ms UI (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм) в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ), газ-носитель – гелий. Температура испарителя – 300°C, температура термостата колонки повышалась со 100°C до 300°C с шагом 30°C/мин, выдерживание составляло 18,5–23,0 мин. Пробу вводили в объеме 0,1–0,2 мкл с делением потока 1:9–1:39. Сканирование проводили в диапазоне молекулярных масс *m/z* 35–535 а.е.м со скоростью 1,5 скана/с. Предварительно пробы обрабатывали (триметилсилил)диазометаном (Sigma-Aldrich, США). Полученные масс-спектры сравнивали с известными масс-спектрами из библиотеки NIST08 MS Library.

Динамику образования продуктов трансформации ОК оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазовой колонке Kromasil 100-5-C18 (C18, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å, 250 мм × 4,6 мм, Ека Chemicals АВ, Швеция). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил:деионизированная вода в процентном соотношении 80:20. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл. Пробы предварительно растворяли в изопропанол или ацетонитриле. Все растворители имели маркировку «ос.ч.» (НПК Криохром, Россия).

Препаративное выделение и идентификация продуктов биотрансформации ОК и ГК. Смесь полученных этилацетатных экстрактов обезвоживали над Na₂SO₄ и фильтровали. Растворитель удаляли путем отгонки на роторном испарителе (Heidolph, Германия). Полученные этилацетатные экстракты растворяли в минимальном количестве хлороформа и разделяли с помощью флэш-хроматографа

(Buchi, Швейцария) с флэш-картриджем Sepacore Silica 40g (No. 11057604, диаметр 26,7 мм, длина 127 мм, силикагель 40–63 мкм). Соотношение вещества и сорбента – 1:30. Для разделения продуктов биотрансформации ГК использовали смесь хлороформ:изопропанол с градиентом концентраций от 100:0 до 99:1. Разделение продуктов биотрансформации ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 проводили 100% хлороформом. Разделение продуктов трансформации ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле (60–200 мкм, Macherey-Nagel, Германия) в системе *n*-гексан:этилацетат с градиентом концентраций от 9:1 до 4:1.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 (Perkin Elmer, США) для раствора вещества в CHCl_3 ($\lambda = 589$ нм). Точку плавления определяли с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) со скоростью нагрева 1°C/мин. Спектры ^1H , ^{13}C и DEPT ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали с помощью ЯМР-спектрометра Bruker AVANCE II (BrukerBioSpin GmbH, Германия) при частоте 400 и 100 МГц соответственно с использованием гексаметилдисилана в качестве внутреннего стандарта. В качестве растворителя использовали CDCl_3 или ДМСО- d_6 .

Рентгеноструктурный анализ (РСА) проводили с использованием монокристалльного дифрактометра Xcalibur Ruby (Agilent Technologies, Великобритания) с CCD-детектором по стандартной методике (MoK α -излучение, 295(2) К, ω -сканирование с шагом 1°).

***In silico* анализ продуктов биотрансформации ОК и ГК.** Токсичность и растворимость ОК, ГК и их производных рассчитывали с помощью программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США). Оценку предполагаемой биологической активности полученных производных ОК и ГК прогнозировали на основе их структурных формул с использованием онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>).

Определение фитотоксичности в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В экспериментах использовали семена, всхожесть которых составляла 95%.

Определение антибактериальной активности. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ОК, ГК и продуктов их биотрансформации в отношении бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 определяли методом двукратных серийных разведений (Wiegand *et al.*, 2008) с использованием 96-луночных полистироловых планшетов. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

Определение цитотоксической активности в отношении раковых клеток молочной железы человека MCF-7, MDA-MB-453, HBL-100 и HBL100/Dox проводили с помощью МТТ-теста (Mosmann, 1983). Исследуемое соединение растворяли в ДМСО и добавляли к клеткам в диапазоне концентраций от 0,3125 до 100 мкМ.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием программ GraphPad Prism 6.0 и Statistica 13 (StatSoft, 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности коллекционных штаммов актиномицетов трансформировать ОК и ГК. По итогам проведенного скрининга 148 коллекционных культур актиномицетов, лишь отдельные штаммы, относящиеся к видам *Rhodococcus jostii* (1 штамм), *R. opacus* (4 штамма), *R. rhodochrous* (5 штаммов) и *R. ruber* (2 штамма), способны использовать ОК или ГК в качестве единственного источника углерода и энергии. Наибольшую трансформирующую активность в отношении тритерпеноидов проявляли штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, отобранные для проведения дальнейших исследований.

Как видно из рис. 1, максимум каталитической активности нативных клеток обоих штаммов в процессе трансформации ГК наблюдался на 2 сут с образованием 44,3–46,7% 3-оксо-ГК, содержание которой увеличивалось до 54,2–57,4% к концу эксперимента. При этом наблюдали значительный прирост биомассы, количество которой на протяжении всего эксперимента было в 4 раза выше, чем в биотическом контроле.

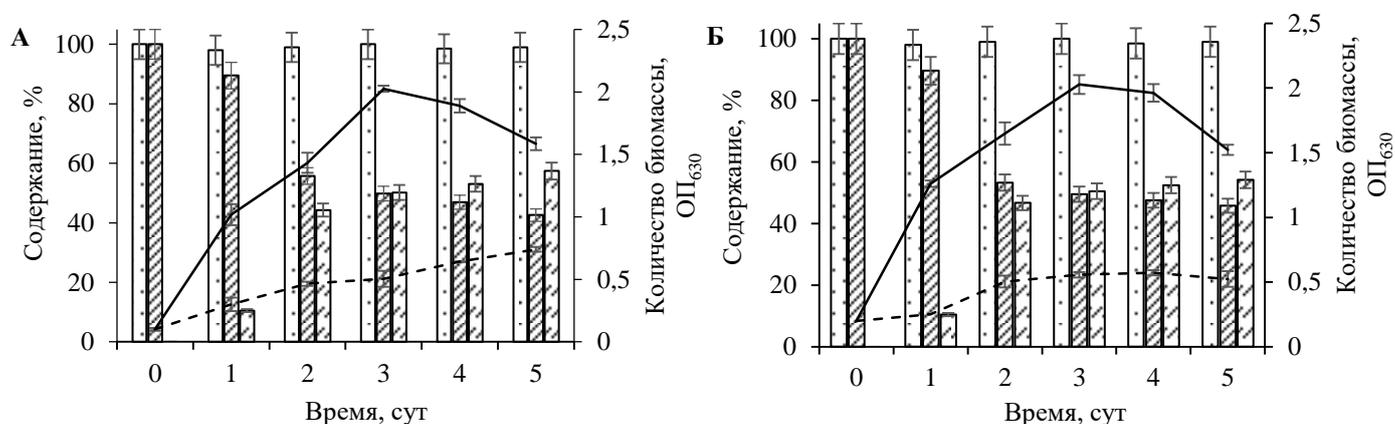


Рисунок 1 – Динамика процесса трансформации ГК (1,0 г/л) с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А) и ИЭГМ 1360 (Б): ГК (▨), 3-оксо-ГК (▧), абиотический контроль (▩). Количество (ОП₆₃₀) бактериальных клеток в присутствии ГК (—) и без ГК (---)

Результаты исследования динамики убыли ОК и прироста клеточной биомассы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 показали, что максимум каталитической активности родококков приходился на 1 сут и сопровождался практически полной (более 98%) деструкцией ОК и значительным увеличением количества биомассы (от ОП₆₃₀ 0,1 до ОП₆₃₀ 1,3) (рис. 2А). При этом было зарегистрировано образование ранее не описанной 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты, содержание которой на 2 сут сокращалось с 28 до 12% и практически не изменялось до окончания эксперимента. На 5-е сут эксперимента количество жизнеспособных клеток сокращалось (до ОП₆₃₀ 0,9), при этом остаточная ОК в посткультуральных экстрактах не детектировалась.

По данным изучения динамики процесса биотрансформации ОК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, максимум каталитической активности родококков приходился на 2 сут и сопровождался образованием 13,1% 3-оксо-ОК, концентрация которой незначительно повышалась (до 17,0%) на протяжении последующих 3 сут. При этом показатель жизнеспособности клеток в присутствии ОК был в 3,7–4,2 раза ниже (ОП₆₃₀ 0,13–0,14), чем в биотическом контроле (ОП₆₃₀ 0,50–0,57), что может свидетельствовать о токсическом эффекте ОК в отношении клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (рис. 2Б).

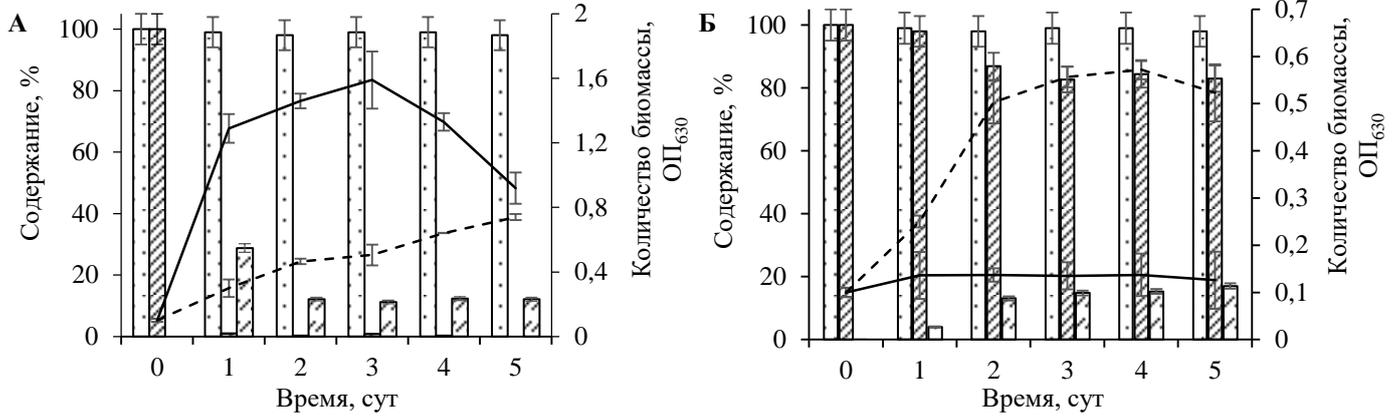


Рисунок 2 – Динамика процесса трансформации ОК (1,0 г/л) с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А) и ИЭГМ 1360 (Б): ОК (▨), продукт трансформации ОК (▧), абиотический контроль (▤). Количество (ОП₆₃₀) бактериальных клеток в присутствии ОК (—) и без ОК (---)

Токсический эффект ОК на клетки штамма ИЭГМ 1360 подтверждался исследованием респираторной активности. Несмотря на практически идентичные профили скорости потребления кислорода в присутствии ОК и без нее, общее количество поглощенного кислорода клетками ИЭГМ 1360 в присутствии тритерпеноида было в 1,2 раза ниже контрольных значений (рис. 4). При этом общее количество поглощенного кислорода клетками штамма ИЭГМ 757 на 4–5 сут в присутствии ОК составляло в 2 раза больше, чем в биотическом контроле (рис. 3). Это свидетельствовало об устойчивой метаболической активности клеток, что приводило к образованию более окисленного продукта – 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты.

В присутствии ГК наблюдалось увеличение продолжительности экспоненциальной фазы роста родококков (с 12 ч до 2 сут), что соотносилось с отмеченным ранее значительным приростом биомассы в течение первых 2–3 сут эксперимента и подтверждало отсутствие токсического эффекта ГК. В контрольных экспериментах в абиотических условиях значения респирации (рис. 3, 4) и скорость трансформации ОК и ГК (рис. 1, 2) были практически равны нулю, что свидетельствует о биокаталитическом характере окисления тритерпеноидов.

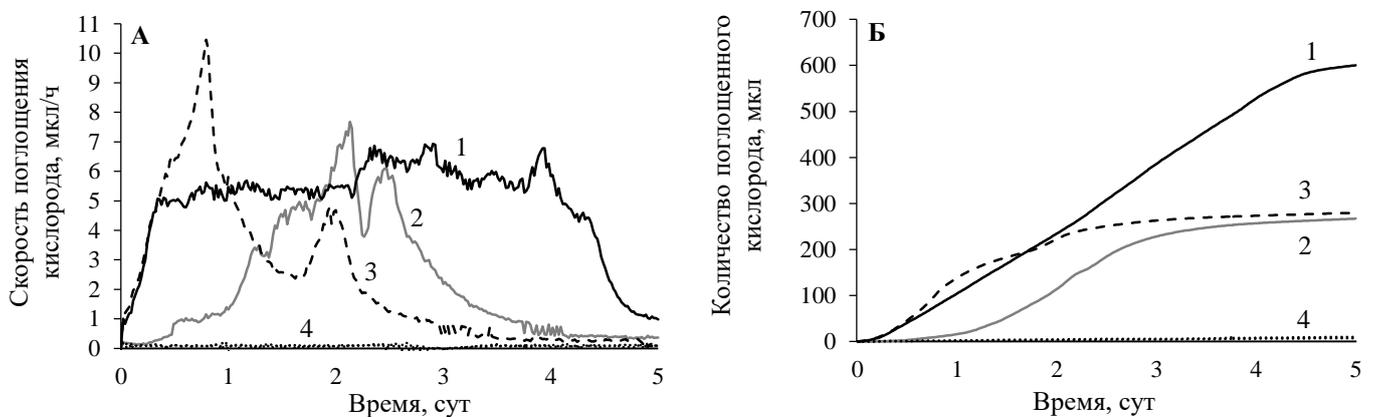


Рисунок 3 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного O_2 (Б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в процессе биотрансформации ОК (1) и ГК (2). Биотический контроль (3) и абиотический контроль (4)

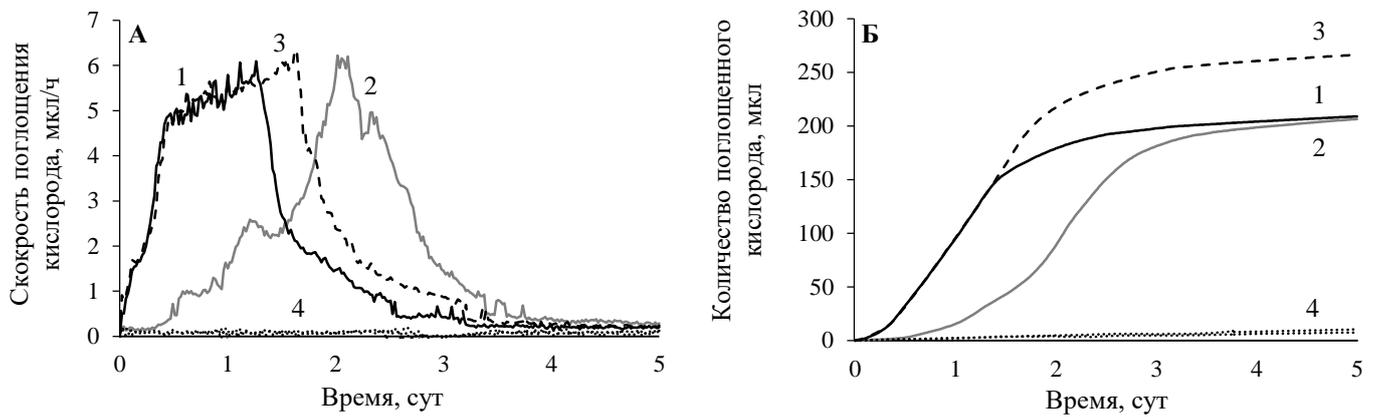


Рисунок 4 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного O_2 (Б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации ОК (1) и ГК (2). Биотический контроль (3) и абиотический контроль (4)

Влияние ОК и ГК на морфометрические и физико-химические характеристики родококков. Установлено, что в процессе биотрансформации ОК родококки формируют крупные обособленные многоклеточные агрегаты или упорядоченные скопления клеток в виде цепочек (рис. 5). По-видимому, образование таких обособленных групп клеток способствует проявлению устойчивой метаболической активности родококков в отношении сложных гидрофобных соединений, обеспечивая высокую каталитическую активность в условиях, когда одиночные клетки не способны к размножению и биоконверсии субстрата.

В присутствии ГК в среде культивирования родококков в первые 2 сут наблюдалось формирование крупных клеточных агрегатов (50–150 мкм), которые в течение последующих 3 сут распадались на более мелкие, и на 5 сут их размер не превышал 20 мкм (рис. 5). Вероятно, такой феномен связан с первичной адаптацией клеток к высокой концентрации ГК, тогда как по мере снижения нагрузки на метаболические системы клеток, необходимость в формировании многоклеточной системы отпадала, и клетки переходили к одиночному способу существования.

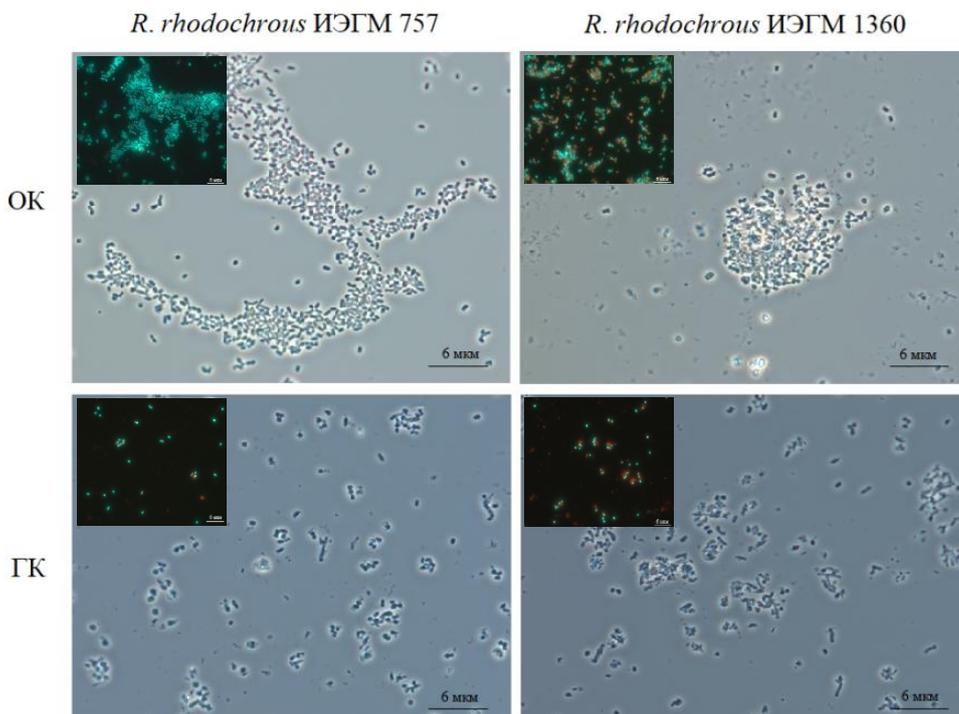


Рисунок 5 – Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, выращенных в течение 5 сут в присутствии ОК или ГК.

Зеленые клетки – живые, красные – мертвые.

Масштаб линейки: 6 мкм

Исследование элементного состава бактериальных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 показало, что независимо от условий культивирования распределение основных элементов в бактериальных клетках происходит равномерно. Однако в присутствии ОК детектирован выход калия из клеток, указывающий на нарушение целостности мембран, а также накопление элементов фосфора и магния, являющихся показателями стресса и участвующих в процессах адгезии клеток (Parikh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019) (рис. 6). При этом в присутствии ГК не было обнаружено клеток с явным цитотоксическим эффектом и скоплением фосфора, магния или других элементов (рис. 6), что подтверждает ранее сделанный вывод о высокой устойчивости данных штаммов родококков к ГК.

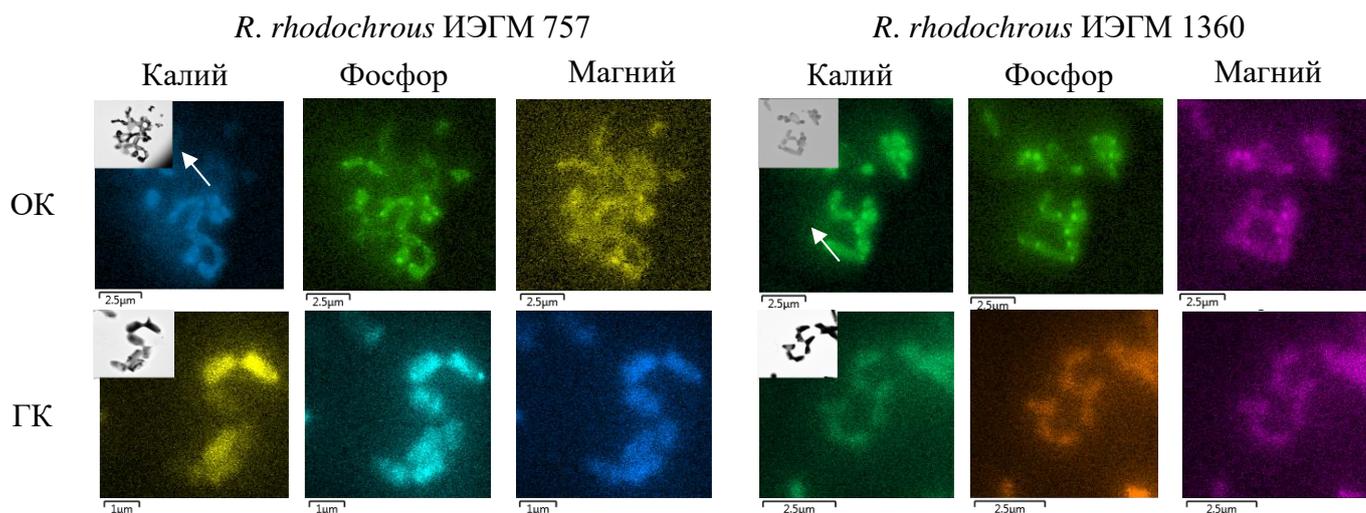


Рисунок 6 – Элементный состав клеток, определенный путем картирования с помощью ЭДС. Стрелкой обозначены клетки с выходом K^+

В клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации ОК наблюдали также достоверное увеличение количества липидных включений, формирование которых, по-видимому, также можно рассматривать как один из механизмов защиты родококков от повреждающего действия ОК (рис. 7).

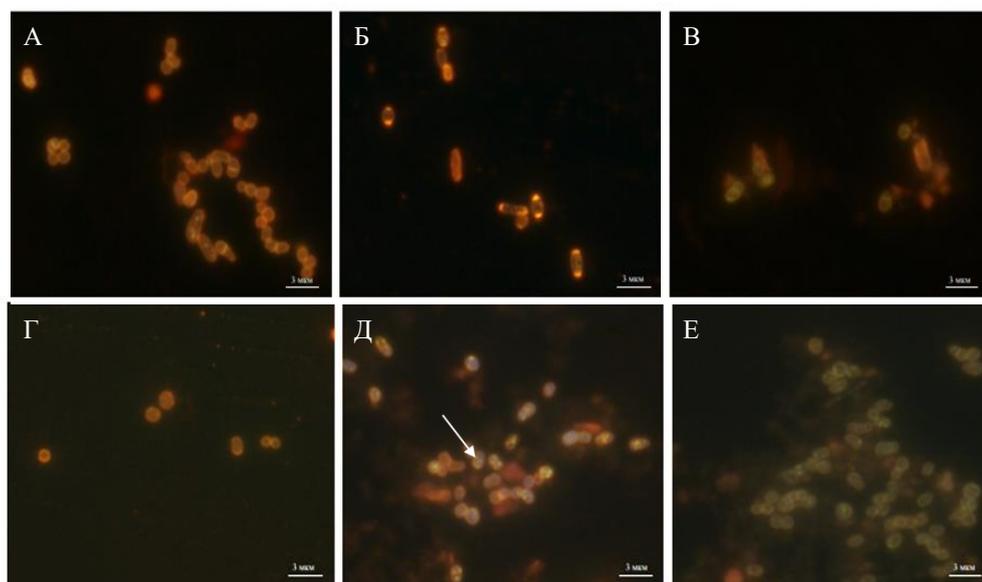


Рисунок 7 – Флуоресцентная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А–В) и ИЭГМ 1360 (Г–Д), окрашенных красителем Nile Red, в присутствии ОК (Б, Д) и ГК (В, Е), А, Г – биотический контроль.

Стрелкой обозначены липидные включения.

Масштаб линейки: 3 мкм

Анализ ультраструктуры клеток методом ПЭМ подтвердил данные по накоплению внутриклеточных липидов, а также наличию внутриклеточных скоплений

фосфора в виде гранул полифосфатов, о чем свидетельствуют зарегистрированные электронно-прозрачные и электронно-плотные округлые области соответственно (рис. 8Б). Кроме того, в присутствии тритерпеноидов отмечали интенсивное разрастание клеточной стенки родококков, появление обильных мембранных выступов и пилей (рис. 8Б, В, Г). Поскольку клеточная стенка и ее поверхность являются основным местом аккумуляции субстратов, можно предположить, что избыточный рост клеточной стенки необходим для создания своеобразного депо, обеспечивающего фиксацию поступающего гидрофобного субстрата для последующего его окисления (Ившина и соавт., 2021). В присутствии тритерпеноидов у некоторых клеток детектировали образование микрокапсул, поверхностных структур в виде рыхлого слоя микрофибрилл полисахаридной природы (рис. 8Б, Г). Такие микрокапсулы играют важную роль в процессах адгезии клеток и защиты их от действия токсических соединений (Iwabuchi *et al.*, 2003). Кроме того, на СЭМ-изображениях в присутствии ОК отмечено увеличение шероховатости клеточной стенки (рис. 8Е).

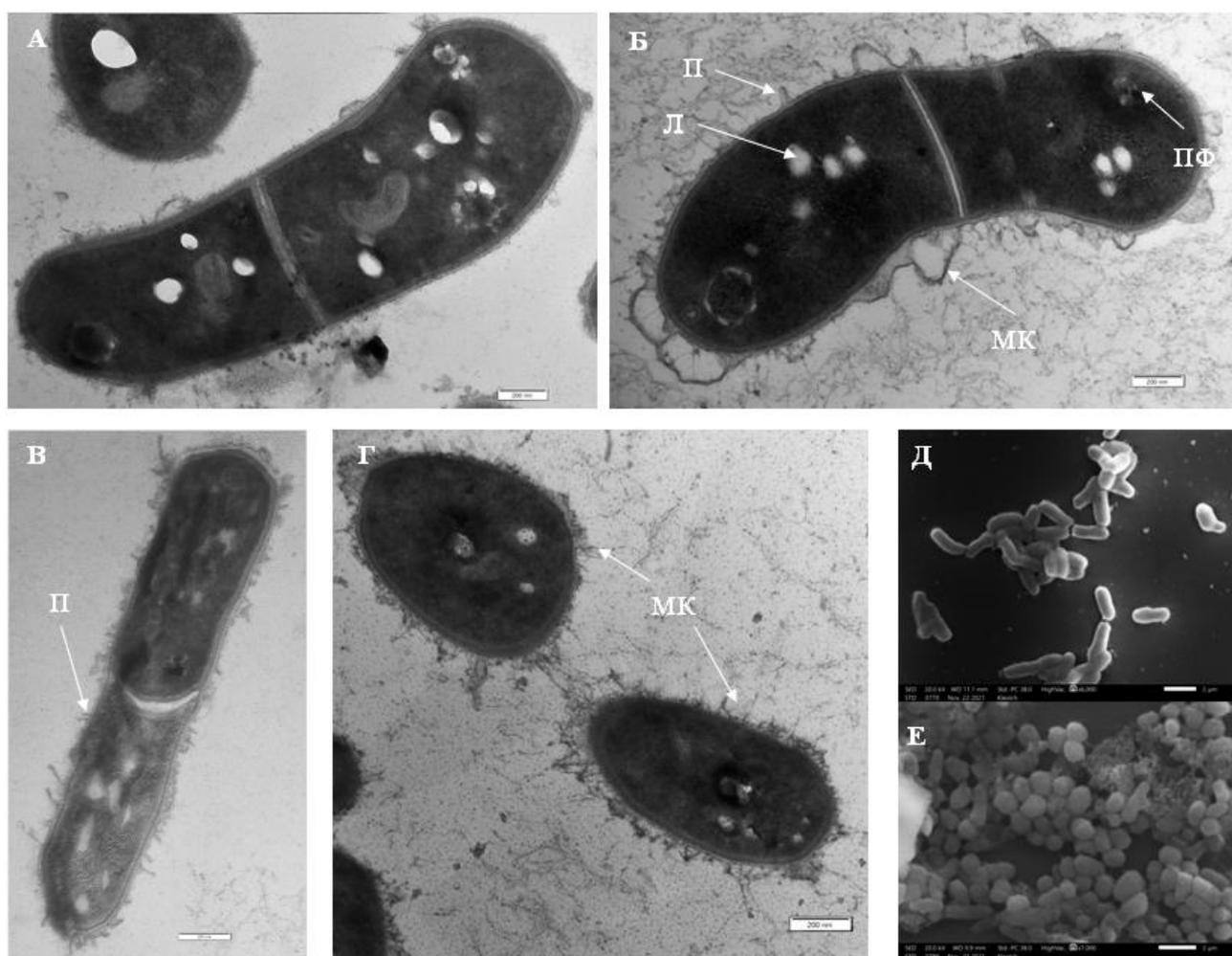


Рисунок 8 – ПЭМ- и СЭМ-изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А, Б, В, Д, Е) и ИЭГМ 1360 (Г). Клетки выращивали на питательной среде (А, Д, контроль), в присутствии ОК (Б, Г, Е) или ГК (В). П – пилы, ПФ – полифосфаты, Л – липидные включения, МК – микрокапсула. Масштаб линейки: 200 нм (А–Г), 2 мкм (Д, Е)

Анализ морфометрических и физико-химических показателей клеток в присутствии нетоксичной ГК позволил выявить увеличение площади и объема бактериальных клеток, что способствует увеличению площади контакта родококков с субстратом для лучшего его поглощения и потребления (таблица 1).

Таблица 1 – Морфометрические и физико-химические показатели бактериальных клеток

Условия	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь (S), мкм ²	Объем (V), мкм ³	S/V, мкм ⁻¹	ζ-потенциал, мВ
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757						
Биотический контроль	1,33 ± 0,09	1,01 ± 0,09	5,85 ± 0,71	1,08 ± 0,21	5,49 ± 0,35	-38,9 ± 6,62
ОК	1,89 ± 0,33	1,00 ± 0,09	7,51 ± 1,36	1,49 ± 0,38	5,12 ± 0,46	-38,1 ± 7,12
ГК	2,03 ± 0,16*	1,10 ± 0,13	8,89 ± 0,94*	1,93 ± 0,34*	4,67 ± 0,41*	-35,9 ± 6,54
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360						
Биотический контроль	1,22 ± 0,18	1,08 ± 0,11	5,99 ± 1,48	1,14 ± 0,44	5,42 ± 0,57	-30,3 ± 6,54
ОК	1,39 ± 0,14	1,17 ± 0,16	7,33 ± 1,55	1,54 ± 0,47	4,93 ± 0,59	-32,8 ± 7,09
ГК	1,55 ± 0,14*	0,99 ± 0,09	6,34 ± 0,86	1,19 ± 0,26	5,38 ± 0,37	-28,0 ± 7,18

Примечание. *Данные достоверно ($p < 0,05$) отличаются от контрольных значений.

Оптимизация процесса биотрансформации ОК и ГК. По нашим данным, биокатализаторы, полученные путем адсорбционной иммобилизации клеток на поверхности полипропиленовых дисков и технической ткани, обладали низкой каталитической активностью в отношении ОК и ГК, остаточная концентрация которых в постферментационной среде на 5 сут составляла более 90%. Ранее аналогичная тенденция значительного снижения трансформационной активности была отмечена при биоконверсии ОК иммобилизованными в альгинат клетками *Nocardia iowensis* (Ludwig *et al.*, 2015). Вероятно, данное явление связано со снижением доступности гидрофобных тритерпеновых субстратов для клеток, закрепленных на поверхности или в толще носителя.

Применение так называемых нерастущих клеток (в нашем понимании, клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания и помещенных в буферный раствор) является одним из широко распространенных методов оптимизации процессов биоконверсии органических соединений. В литературе описано много примеров использования таких клеток для биотрансформации β-ситостерола, андростендиона, дегидроабиеиновой кислоты, бетулина и других соединений (Иванова и соавт., 2022; Angelova *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009; Ivshina *et al.*, 2012; Grishko *et al.*, 2013). По нашим данным, значительному сокращению продолжительности процесса биотрансформации ОК и ГК способствовало использование буферных растворов с pH 8,0 и 6,0 соответственно. Так, биотрансформация ОК суспензиями нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 с ОП₆₀₀ 2,0 в буфере с pH 8,0 сопровождалась образованием 90% 5α,22α-дигидроксигипсогеновой кислоты в течение 1 сут и 14% 3-оксо-ОК в течение 3 сут соответственно. Тогда как использование суспензий клеток штаммов ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 с ОП₆₀₀ 2,0 в буфере с pH 6,0 для биотрансформации ГК приводило к образованию 23 и 31% 3-оксо-ГК в течение 3 сут соответственно.

Показана взаимосвязь между каталитической активностью и оптической плотностью суспензий. Установлено, что конверсия ОК происходила наиболее эффективно при использовании суспензии клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с ОП₆₀₀ 2,6, а *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 с ОП₆₀₀ 2,0 (рис. 9); конверсия ГК – при

использовании клеточной суспензии обоих штаммов с ОП₆₀₀ 2,2 (рис. 10). Стоит отметить, что увеличение количества биомассы до ОП₆₀₀ 2,8 (концентрация клеток 28–31 г/л) приводило к снижению уровня биоконверсии как ОК, так и ГК, что соотносится с полученными ранее результатами по биотрансформации бетулина нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 (Grishko *et al.*, 2013). Наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен снижением массопереноса и парциального давления кислорода при увеличении плотности биомассы клеток и перераспределением субстрата в буферной системе.

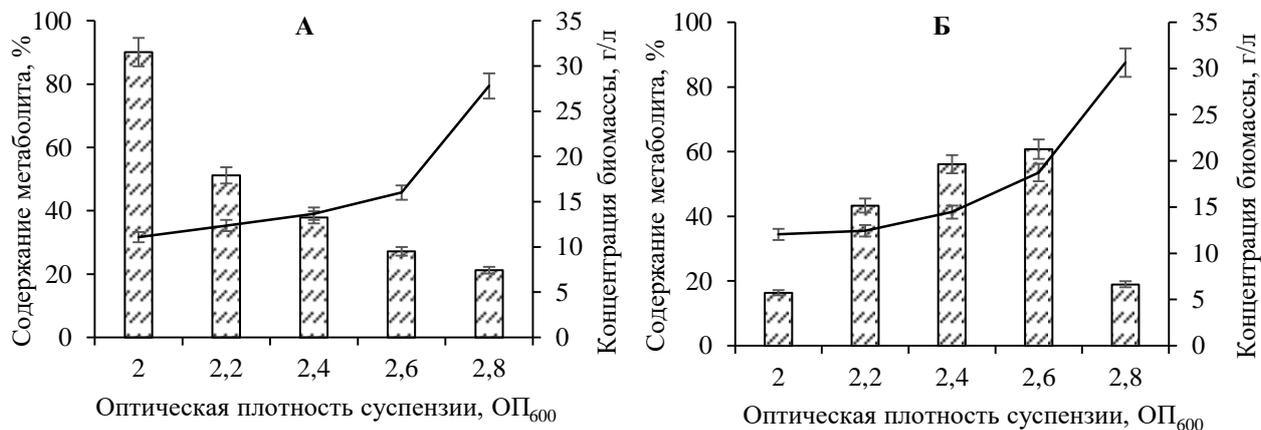


Рисунок 9 – Содержание метаболитов (▨) в экстрактах, полученных после 1 (А) или 3 (Б) сут процесса биотрансформации ОК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А) или ИЭГМ 1360 (Б) в буфере с рН 8,0

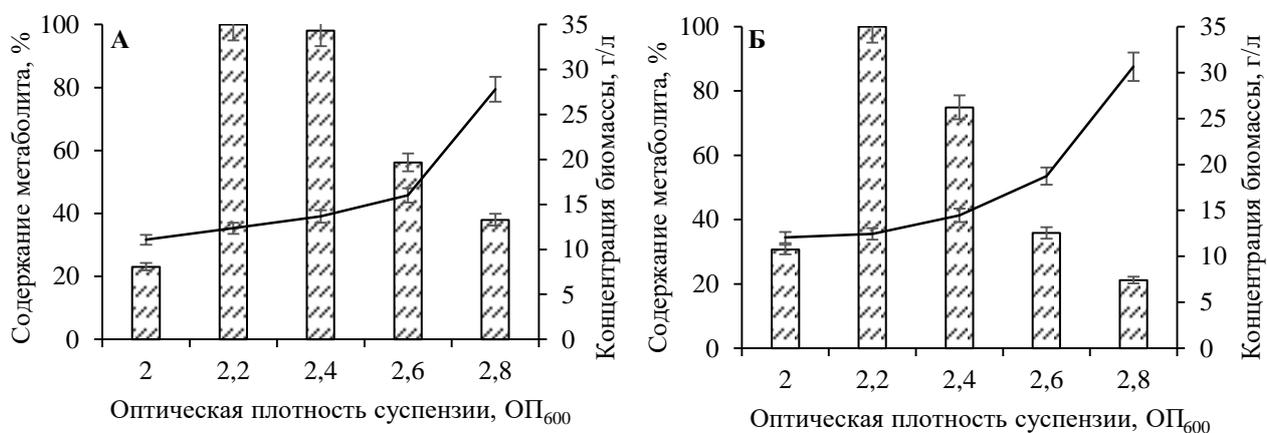


Рисунок 10 – Содержание 3-оксо-ГК (▨) в экстрактах, полученных после 3 сут процесса биотрансформации ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А) или ИЭГМ 1360 (Б) в буфере с рН 6,0

Из всех исследованных буферных растворов наиболее низкая растворимость ОК и ГК наблюдалась в буферах с рН 8,0 и рН 6,0 соответственно. Предполагаем, что высокая каталитическая активность клеток в отношении тритерпеноидов в данных условиях обусловлена характером их взаимодействия с кристаллическим субстратом, а именно возможностью формирования агрегатов на поверхности гидрофобных частиц ОК и ГК. Известно, что актиномицеты, взаимодействуя с гидрофобными соединениями, синтезируют гликолипидные биосурфактанты, функция которых также состоит в растворении субстрата и запуске механизма транспорта его в клетку (Ivshina *et al.*, 1998). Ранее было показано, что процесс биотрансформации терпеноидов бетулина и дегидроабетиновой кислоты сопровождался адгезией клеток на поверхности субстратов и образованием внеклеточной липофильной жидкости,

предположительно биосурфактанта (Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018). Если допустить, что трансформация ОК и ГК родококками протекает аналогичным образом, то высокая каталитическая активность в отношении ОК и ГК может быть обусловлена образованием многокомпонентной подвижной мезофазы в виде биосурфактанта, детектируемого с использованием АСМ и совмещенного АСМ-КЛСМ сканирования (рис. 11). Секреция таких внеклеточных полимеров способствует изменению рельефа клеточной поверхности, в частности выявленному нами повышению шероховатости, и увеличению Ван-дер-Ваальсовых сил, что обеспечивает более эффективный контакт клеток с субстратом и обуславливает повышенный уровень его конверсии (Uzoeshi, Abu-Lail, 2019).

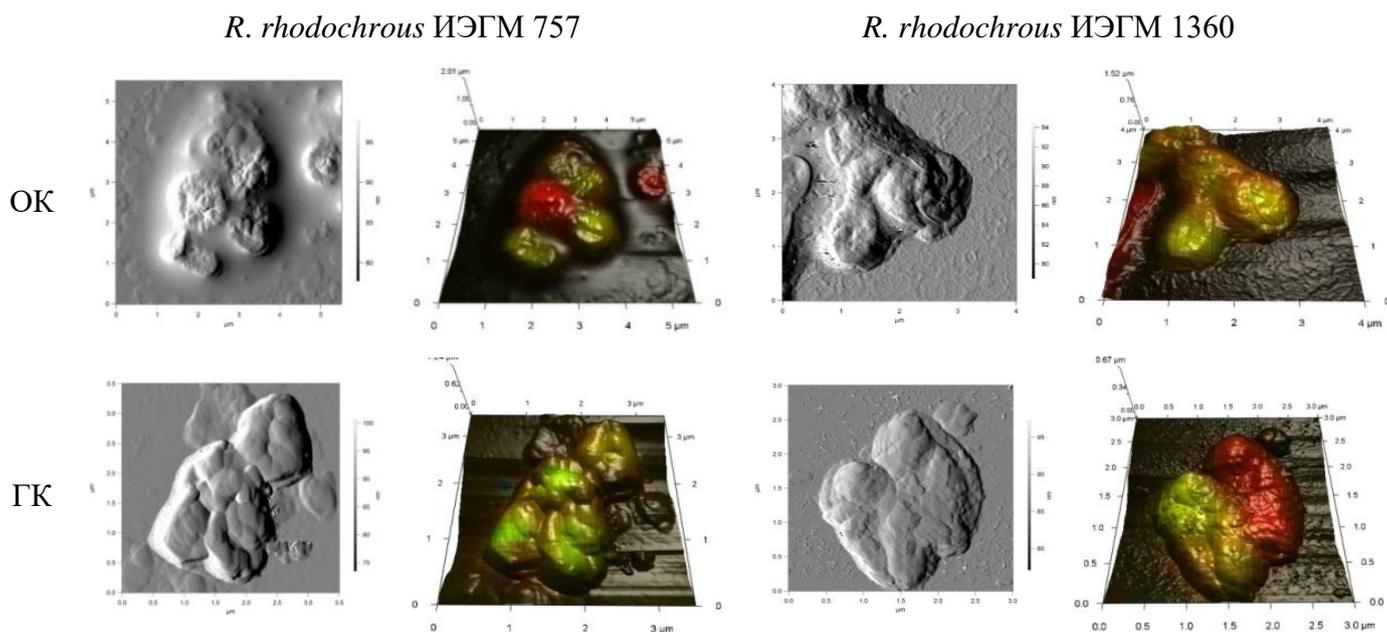


Рисунок 11 – АСМ- и совмещенные АСМ-КЛСМ-изображения нерастаущих клеток в присутствии ОК или ГК

Оценка биологического потенциала производных. В процессе биотрансформации ОК и ГК нами была задокументирована реакция селективного окисления С3 атома тритерпеноидов с образованием 3-оксопроизводных. При использовании клеток штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 зарегистрированы новые реакции С5 гидроксирования и С23 карбоксилирования с одновременным С22 гидроксированием и сохранением нативной ОН группы при С3 атоме и двойной связи молекулы ОК с образованием нового ранее неопisanного 5 α ,22 α -дигидроксипроизводного редкого природного тритерпеноида гипсогеновой кислоты (рис. 12).

С позиций зелёной фармацевтики при создании новых фармацевтических препаратов необходимо учитывать экологические риски их использования для того, чтобы свести к минимуму нежелательные последствия воздействия на природную среду (Daughton, Ruhoy, 2011). ECOSAR-анализ полученных производных показал, что, по сравнению с исходными соединениями, 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК могут обладать сниженной острой и хронической токсичностью. Однако, как исходные кислоты, так и их 3-оксопроизводные потенциально характеризуются крайне низкой растворимостью в воде. При этом новая 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновая кислота предположительно имеет значительно (более чем в 770 раз) повышенную растворимость в воде и сниженную токсичность в отношении водных организмов. При

оценке влияния ОК, ГК и их производных на тест-объект овёс посевной *Avena sativa* L. также выявлено отсутствие фитотоксического эффекта на модельное растение.

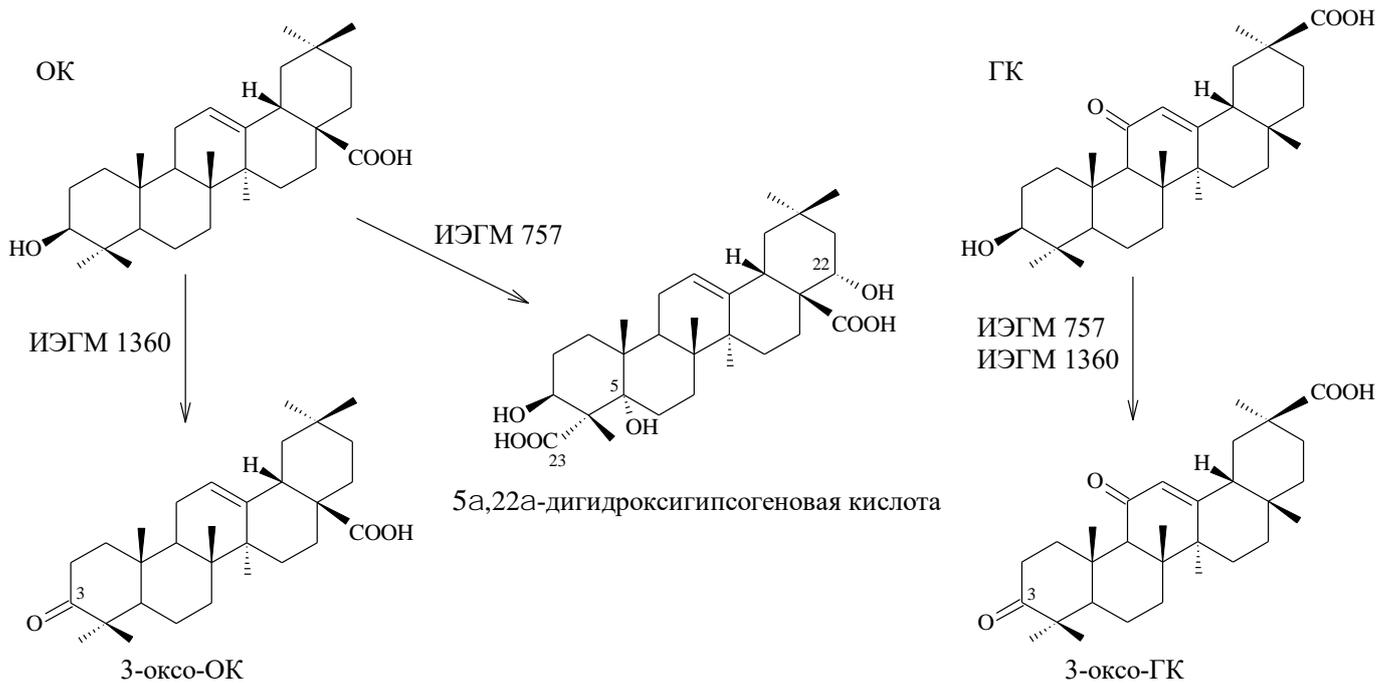


Рисунок 12 – Схема биотрансформации ОК и ГК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360

Ранее способом *in vitro* была выявлена ингибирующая активность 3-оксо-ГК в отношении липоксигеназ, катализирующих биосинтез продуктов, способствующих развитию воспалительных, аутоиммунных заболеваний, бронхиальной астмы и рака (Choudhary *et al.*, 2009), а также методом *in silico* – ингибирующая активность производного в отношении протеазы M^{pro} вируса SARS-CoV-2 (Florez, Singh, 2020). Известно, что 3-оксо-ОК обладает выраженным противоопухолевым (Huang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011; Irungu *et al.*, 2014), антипаразитарным (Begum *et al.*, 2015; Funari *et al.*, 2016) и противовоспалительным (Giner-Larza *et al.*, 2001) действием. Проведенное нами исследование предполагаемой биологической активности соединений на основе их структурных формул с помощью онлайн-сервиса PASS позволило установить, что 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК с высокой степенью вероятности также могут выступать в качестве агониста апоптоза и антиоксидантного агента соответственно. Оценка предполагаемой биоактивности 5α,22α-дигидроксигипсогеновой кислоты показала, что данное вещество с высокой долей вероятности может обладать противоопухолевой, противовоспалительной, гепатопротекторной, обезболивающей, химиопрофилактической активностью, а также выступать в качестве промотора инсулина и стимулятора апоптоза.

Известна ингибирующая активность нативных ОК и ГК в отношении патогенных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* (Duric *et al.*, 2013; Kannan *et al.*, 2019). Несмотря на то, что с использованием программы PASS Online нами не выявлен антибактериальный потенциал полученных производных, проведенная экспериментальная оценка *in vitro* полученных метаболитов показала, что процессы окисления ОК способствуют повышению антибактериальной активности производных. Так, 3-оксо-ОК и 5α,22α-дигидроксигипсогеновая кислота проявляли антибактериальную активность в отношении исследованных тест-культур (таблица 2). При этом наибольшей резистентностью характеризовалась грамотрицательная *E. coli*, а наибольшей чувствительностью – грамположительная *B. subtilis*.

Таблица 2 – Антибактериальная активность (МПК, мг/мл) ОК, ГК и продуктов их биотрансформации

Соединение	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 196	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
ОК	12,5	>100	>100	12,5
3-оксо-ОК	3,125	12,5	50	0,098
5 α ,22 α -дигидрокси- гипсогеновая кислота	0,781	1,563	0,781	0,781
ГК	>100	25	>100	0,195
3-оксо-ГК	>100	25	>100	50
Ампициллин	25	0,781	3,125	12,5
Канамицин	0,39	<0,024	<0,024	<0,024

С учетом известной противоопухолевой активности ОК и гипсогеновой кислоты (Krasteva *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016), а также проапоптической и противоопухолевой активности 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты, выявленной нами с помощью программы PASS Online, были проведены эксперименты по определению цитотоксического эффекта данного метаболита. Однако выраженной цитотоксической активности соединения в отношении исследованных линий клеток не наблюдалось. Известно, что тритерпеновые соединения обладают высокой селективностью в отношении определенных линий раковых клеток (Chudzik *et al.*, 2015), в связи с чем сохраняется вероятность обнаружения противоопухолевой активности соединения в отношении других клеточных линий. При этом необходимо отметить, что отсутствие цитотоксического эффекта и выявленное антибактериальное действие производного свидетельствуют о необходимости его дальнейшего изучения и возможности использования в качестве антибактериального агента.

Определение ферментных систем, участвующих в процессе биотрансформации ОК и ГК. С использованием отдельных клеточных фракций экспериментально подтверждено участие в процессах биотрансформации ОК и ГК ферментов, связанных с клеточной мембраной. При этом экстрагируемые детергентом ферменты осуществляли частичную деградацию тритерпеноидов без образования каких-либо продуктов, тогда как прочно связанные с клеточной стенкой ферментные системы катализировали биоконверсию ОК и ГК с образованием окисленных производных (таблица 3).

Полногеномное секвенирование штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 и последующий биоинформатический анализ полученных данных позволили провести исследование их генетического потенциала. По данным онлайн-сервиса RAST, размер геномов штаммов-биотрансформаторов составлял 6,4 и 5,7 Мбр, а содержание GC было на уровне 67,6 и 67,8% соответственно. Распределение генов с известной и неизвестной функцией составляло 23:77 и 22:78 соответственно. Методом геномного майнинга обнаружены генные кластеры синтеза каротиноидов, поликетидов, нерибосомных пептид синтаз, гетеробактеринов, бутиро- и β -лактонов, а также в случае *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 обнаружен дополнительный кластер синтеза ϵ -поли-*L*-лизина.

Таблица 3 – Биотрансформация ОК и ГК с использованием клеточных фракций

Клеточная фракция	Содержание, %			
	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757		<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360	
	ОК	Продукты трансформации	ОК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	35,5	0,0	68,76	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	48,8	2,49	94,05	3,95
	ГК	Продукты трансформации	ГК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	86,9	0,0	96,8	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	65,2	29,5	48,4	51,6

В результате автоматической обработки и аннотирования NGS-данных геномов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 были выявлены 30 и 13 генов, кодирующих ферменты семейства CYP450, соответственно. Парное сравнение генов внутри каждого штамма показало отсутствие значимых совпадений в режиме Megablast. Этот факт свидетельствовал о том, что все обнаруженные гены являются отдельными функциональными единицами. С использованием ПЦР в реальном времени подобраны условия для детекции 24 и 10 из совокупности обнаруженных генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 соответственно (рис. 13).

Полученные данные создают предпосылки для дальнейших генетических манипуляций и детального изучения транскриптомов штаммов-биотрансформаторов с целью обнаружения бактериальных ферментов биоконверсии ОК и ГК и кодирующих их функциональных генов.

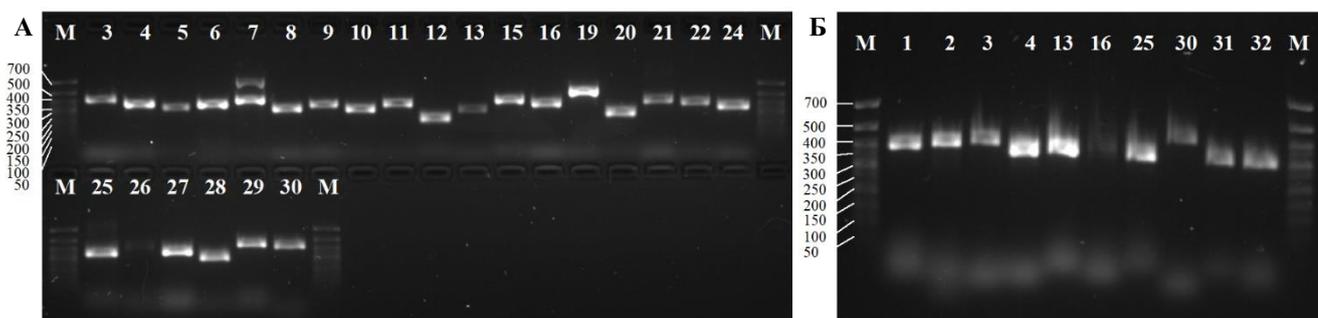


Рисунок 13 – Гель-электрофорез продуктов ПЦР в реальном времени *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А) и ИЭГМ 1360 (Б) со специфическими праймерами к генам, кодирующим CYP450: М – маркер длин ДНК от 700 до 50 п.н.

Заключение. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmcoll.ru>) впервые установлена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда на примере ОК и ГК. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 с наибольшей каталитической активностью в отношении данных тритерпеноидов в высокой (1,0 г/л) концентрации.

При исследовании механизмов взаимодействия родококков с тритерпеновыми кислотами задокументированы морфологические изменения в клетках, в частности их линейных размеров и рельефа клеточной поверхности, увеличение числа цитоплазматических полифосфатных и липидных включений, а также формирование многоклеточных агрегатов.

При определении оптимальных условий окислительной трансформации ОК и ГК подтверждена эффективность использования нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, что позволило сократить продолжительность процесса с 5 до 1–3 сут и увеличить выход целевых продуктов до 60–100%. Показано, что взаимодействие нерастущих бактериальных клеток с ОК и ГК сопровождалось накоплением внеклеточной липофильной жидкости (по нашему предположению, биосурфактанта) и повышением шероховатости клеточной стенки. Это может способствовать усилению адгезии бактериальных клеток к субстрату и обеспечивать максимальный выход целевых продуктов.

Полногеномное секвенирование штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* позволило провести анализ генетического потенциала и выявить особенности катаболических процессов биотрансформации ОК и ГК. С применением методов биоинформатического анализа и последующей постановки ПЦР в реальном времени составлен Каталог генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, кодирующих ферменты семейства CYP450, которые участвуют в процессах окисления пентациклических тритерпеноидов. Полученные данные создают предпосылки для дальнейшего изучения транскриптомов штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* с целью определения участвующих в процессе конверсии ОК и ГК ферментов и кодирующих их функциональных генов.

Полученные данные расширяют представление о биокаталитическом потенциале актиномицетов рода *Rhodococcus* и перспективности их использования для биотрансформации растительных пентациклических тритерпеноидов с целью получения новых фармакологически значимых соединений.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга большого числа (148) бактериальных штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc01.ru>) впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, обладающие выраженной каталитической активностью в отношении ОК и ГК в высокой (1,0 г/л) концентрации и обеспечивающие селективное С3 окисление ОК и ГК, а также образование нового ранее неопisanного полиоксигенированного производного ОК.

2. С использованием методов электронной визуализации, электрофоретического рассеяния света и спектрофотометрии выявлены универсальные адаптационные приспособления, типичные для родококков в условиях контакта с тритерпеновыми кислотами: изменение морфометрических характеристик, перестройка поверхностных структур клетки, усиление гидрофобных взаимодействий между клетками, адгезия, переход от одиночного к агрегированному состоянию, синтез резервных энергетических веществ (липиды, полифосфаты).

3. Установлено, что использование суспензий нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (ОП₆₀₀ 2,0) и ИЭГМ 1360 (ОП₆₀₀ 2,2) в слабощелочной среде (рН 8,0) способствует повышению выхода целевых производных ОК (до 90 и 61% соответственно) и сокращению процесса биотрансформации с 5 до 1 и 3 сут соответственно. Применение суспензий нерастаущих клеток (ОП₆₀₀ 2,2) в слабокислых условиях (рН 6,0) обеспечивает наибольший (до 100%) выход 3-оксо-ГК в течение 3 сут.

4. Процесс биотрансформации ГК с участием обоих штаммов приводит к накоплению 3-оксо-ГК. Процесс трансформации ОК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 сопровождается образованием 3-оксо-ОК, трансформация ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 протекает с образованием нового ранее неопisanного соединения 3 β ,5 α ,22 α -тригидрокси-олеан-12-ен-23,28-диовой (5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой) кислоты. Способом *in vitro* выявлена антибактериальная активность 3-оксо-ОК и 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты, *in silico* установлена пониженная токсичность метаболитов по сравнению с исходными кислотами и перспективность их применения в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов.

5. Экспериментально подтверждено участие мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе окислительной биотрансформации ОК и ГК. С использованием результатов NGS-секвенирования и последующей постановки ПЦР в реальном времени выявлены гены, кодирующие ферменты окислительной трансформации ОК и ГК, принадлежащие к семейству CYP450.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз:

1. **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids // *Molecules*. – 2020. – V. 25, No. 23. – 5526. DOI: 10.3390/molecules25235526 (Q2, IF 3,267).

2. **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Kostrikin N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanolic acid using *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 757 // *Catalysts*. – 2022. – V. 12, No. 11. – 1352. DOI: 10.3390/catal12111352 (Q2, IF 4,501).

3. **Лучникова Н.А.**, Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 – эффективный биокатализатор С3 окислительной трансформации олеанановых тритерпеноидов // *Микробиология*. – 2023. – Т. 92, № 2. – С. 184–196. DOI: 10.31857/S0026365622600742 (Q4, IF 1,511).

4. Tarasova E.V., **Luchnikova N.A.**, Grishko V.V., Ivshina I.B. Actinomycetes as producers of biologically active terpenoids: Current trends and patents // *Pharmaceuticals*. – 2023. – V. 16, No. 6. – 872. DOI: 10.3390/ph16060872 (Q1, IF 5,215).

Патенты:

Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б. Способ получения 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*. Заявка 2023111046/10(023624) от 28.04.2023 на получение патента РФ.

Тезисы докладов на российских и международных конференциях:

1. **Лучникова Н.А.**, Мальцева П.Ю., Гришко В.В., Ившина И.Б. Поиск штаммов – активных биотрансформаторов олеаноловой кислоты // *Материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2019»* (Пермь, 13–15 мая 2019). – С. 50–51.

2. **Лучникова Н.А.**, Иванова К.М., Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биоконверсия тритерпеноидов олеананового типа актинобактериями // *Сборник научных трудов IX Информационной школы молодого ученого* (Екатеринбург, 20–23 сентября 2021). – С. 15–26.

3. **Luchnikova N.A.**, Ivanova K.M., Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Actinobacterial transformation of oleanane triterpenoids // *Сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования»* (Пермь, 18–20 октября 2021). – С. 5–7.

4. **Лучникова Н.А.**, Гришко В.В., Ившина И.Б. Перспективные биокатализаторы конверсии олеанановых пентациклических тритерпеноидов // *Сборник материалов VII Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»* (Пущино, 6–9 декабря 2021). – С. 252–254.

5. **Лучникова Н.А.**, Гришко В.В., Ившина И.Б. Родококки как эффективные катализаторы биосинтеза терапевтически значимых соединений на основе олеанановых тритерпеноидов // *Тезисы докладов Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов»* (Владивосток, 19–23 сентября 2022). – С. 67.

6. **Luchnikova N.A.**, Maltseva P.Yu., Grishko V.V., Ivshina I.B. Features of the bioconversion of pentacyclic triterpenoid oleanolic acid using *Rhodococcus* actinobacteria // *KnE Life Sciences / 8th Scientific and Practical Conference «Biotechnology: Science and Practice»* (Ялта, 22–26 сентября 2020). – 2022. – P. 304–318. ISSN 2413-0877.

Лучникова Наталья Алексеевна

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ
ОЛЕАНАНОВОГО РЯДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИНОМИЦЕТОВ
РОДА *RHODOCOCCUS***

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1.

Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в «ИЭГМ УрО РАН»
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13