

УДК 579.66+547.92

ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ РОДОКОККОВ С ЦЕЛЬЮ БИОТРАНСФОРМАЦИИ β -СИТОСТЕРОЛА

© Е. М. Ноговицина^{1*}, Г. А. Бажутин², В. В. Гришко³

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения РАН
Россия, 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13.

²Пермский государственный национальный исследовательский университет
Россия, 614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15.

³Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук
Россия, 614013 г. Пермь, ул. Академика Королева, 3.

Тел.: +7 (342) 280 81 14.

*Email: nogov@iegm.ru

С использованием иммобилизованных актинобактерий рода *Rhodococcus* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegm.ru/iegmcol) исследован процесс биотрансформации β -ситостерола. Установлено, что закрепленные на технической полимерной ткани родококки в присутствии глюкозы проявляют высокую трансформирующую активность в отношении β -ситостерола. Максимальная (от 44 до 64%) степень окислительной биотрансформации β -ситостерола с образованием фармакологически активного соединения стигмаст-4-ен-3-она достигается при использовании клеток *R. ruber* ИЭГМ 220 и *R. ruber* ИЭГМ 233.

Ключевые слова: биотрансформация, актинобактерии рода *Rhodococcus*, иммобилизация, β -ситостерол, стигмаст-4-ен-3-он.

Введение

Иммобилизация (фиксация) бактерий на твердых поверхностях – один из эффективных способов повышения их каталитической активности. Иммобилизованные клетки по сравнению с незакрепленными обладают повышенной жизнеспособностью и стабильностью в экстремальных условиях внешней среды, устойчивостью к высоким концентрациям токсичных органических соединений и растворителей [1]. В отличие от свободных клеток способность иммобилизованных бактерий к биотрансформации β -ситостерола – ценного источника физиологически активных стероидных соединений исследована недостаточно. Ранее нами [2-4] проведено детальное изучение процесса биотрансформации β -ситостерола свободными клетками актинобактерий рода *Rhodococcus*. Установлено, что родококки, растущие в присутствии *n*-гексадекана, эффективно (50–95%) трансформируют β -ситостерол с образованием стигмаст-4-ен-3-она, обладающего гипогликемической и вазодепрессивной активностью, а также перспективного для лечения гиперплазии простаты [5–7].

Цель настоящей работы – поиск носителя для иммобилизации, при использовании которого достигается наиболее высокий уровень биотрансформации β -ситостерола закрепленными клетками родококков.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 179, *R. globerulus* ИЭГМ 591, *R. rhodnii* ИЭГМ 555, *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, ИЭГМ 760 и *R. ruber* ИЭГМ 85, ИЭГМ 220, ИЭГМ 233, ИЭГМ 381,

хранящиеся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegm.ru/iegmcol).

Эксперименты проводили с использованием носителей различного происхождения (табл. 1).

Таблица 1
Носители, использованные в работе

Материал носителя	Изготовитель
<i>Углеродный</i> Каталитический волокнистый углерод, d частиц = 1–2 мм	Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия
<i>Минеральный</i> Силикагель крупный гранулированный, d частиц 2.7–8.0 мм	«Реактив», Санкт-Петербург, Россия
<i>Кератинсодержащий</i> Куриные перья, дезинфицированные кипячением	Институт элементо-органических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
<i>Полимерный</i> Ткань техническая из нитей СВМ арт. 56313 "Н" ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88, S кусков = 1 см ²	ООО «УкрматериалИнвест», Харьков, Украина

Для получения иммобилизованных клеток родококки предварительно культивировали на орбитальном шейкере (150 об/мин) при температуре 28 °С в течение 2 сут. В качестве инкубационных сред использовали мясопептонный бульон, минеральную среду К состава (г/л): KNO₃ – 1.0, KH₂PO₄ – 1.0, K₂HPO₄×3H₂O – 1.0, NaCl – 1.0, MgSO₄×7H₂O – 0.2, CaCl₂×2H₂O – 0.02 с добавле-

нием дрожжевого экстракта (10.0 г/л) и глюкозы (10.0 г/л), а также глюкозосодержащую среду D. Wilmańska с соавт. [8] состава (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O - 1.0$, $(NH_4)_2HPO_4 - 1.5$, $MgSO_4 \times 7H_2O - 0.1$, $FeSO_4 \times 7H_2O - 0.01$, $ZnSO_4 \times 7H_2O - 0.002$, глюкоза – 5.0, дрожжевой экстракт – 10.0. Дополнительно в качестве индуктора в среды вносили 0.2 г/л β -ситостерола в виде 10% раствора в изопропанол. Через 2 сут родококки отделяли от инкубационной среды центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин и дважды промывали фосфатно-щелочным буфером ($KH_2PO_4/NaOH$, pH 7). Затем к 50 мл приготовленной в этом же буфере клеточной суспензии (OD_{600} 1.0) добавляли 4 см³ носителя. Иммунизацию проводили в течение 5 сут на орбитальной качалке (130 об/мин) при температуре 28 °С. Показатель абсорбции клеток родококков на поверхности носителей определяли каждые 24 ч на спектрофотометре Lambda EZ201 «Perkin-Elmer» (США) по изменению оптической плотности суспензии.

Биотрансформацию β -ситостерола проводили в минеральной среде К с добавлением глюкозы (10 г/л) или *n*-гексадекана (0.1 об.%); глюкозосодержащей среде D. Wilmańska с соавт. [8]; фосфатно-щелочном буфере pH 7. β -Ситостерол добавляли в среду в концентрации 0.5 г/л в виде 10% раствора в изопропанол одновременно с биокатализатором. В отдельных экспериментах использовали иммобилизованные клетки, предварительно выдержанные в течение 2 сут в глюкозосодержащих средах с добавлением 0.2 г/л β -ситостерола.

В экспериментах применяли β -ситостерол «Sigma-Aldrich» (США). Образец стигмаст-4-ен-3-она получен из Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН. Продукты микробного окисления β -ситостерола экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , растворитель удаляли на роторном испарителе. Качественный и количественный состав полученных смесей анализировали методом ТСХ с использованием пластин «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-УФ фирмы ЗАО «Сорбполимер» (Россия) [7], УФ-спектроскопии на спектрофотометре Lambda EZ201 «Perkin-Elmer» (США) и хроматомасс-спектрометрической системы Agilent 6890/5973N (кварцевая колонка HP-5MS

SN US 15189741-1) «Agilent technology» (США). Эксперименты проводили в 3 кратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 2, максимальная (от 60 до 94%) степень адсорбции родококков регистрируется на поверхности технической полимерной ткани (ТПТ) или каталитического волокнистого углерода (КВУ). Установлено, что количество закрепленных родококков на носителях зависит от условий их предварительного выращивания. Так, культивирование *R. ruber* ИЭГМ 233 в глюкозосодержащей среде D. Wilmańska с соавт. [8] с добавлением β -ситостерола приводит к повышению их адсорбционной способности к поверхности куриных перьев или ТПТ в 1.2–2.1 раза по сравнению с остальными вариантами опыта.

Установлено, что наиболее высокий (52–57%) уровень окислительной активности родококков в отношении β -ситостерола достигается в присутствии глюкозы при использовании в качестве носителя ТПТ. Необходимым условием эффективной биотрансформации исходного стерола с образованием стигмаст-4-ен-3-она является использование бактериальных клеток, иммобилизованных после предварительной инкубации в среде D. Wilmańska с соавт. [8] с добавлением β -ситостерола (рис. 1).

Примечание. Иммунизацию проводили с использованием родококков, предварительно выращенных без добавления β -ситостерола (числитель) или с добавлением 0.2 г/л β -ситостерола в виде 10% раствора в изопропанол (знаменатель).

С целью подбора оптимальных условий процесса биотрансформации β -ситостерола иммобилизованными родококками исследована стеролтрансформирующая активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 233, закрепленных на технической полимерной ткани и выдержанных в течение 2 сут в присутствии глюкозы и 0.2 г/л β -ситостерола в качестве индуктора. Установлено, что после переноса данных бактерий в свежую питательную среду их способность к окислительной трансформации β -ситостерола повышается на 6–7% по сравнению с клетками без дополнительной инкубации в присутствии глюкозы и β -ситостерола (табл. 3).

Таблица 2

Степень адсорбции (%) клеток *R. ruber* ИЭГМ 233 на поверхности носителей

Носители	Среды культивирования родококков до этапа иммобилизации		
	Мясопептонный бульон	Минеральная среда К	D. Wilmańska с соавт. [8]
КВУ	93.4 ± 0.76	93.6 ± 0.81	77.3 ± 1.04
	74.8 ± 8.85	84.8 ± 5.17	85.0 ± 3.49
ТПТ	60.5 ± 0.15	60.2 ± 3.93	57.0 ± 10.02
	52.8 ± 11.21	55.5 ± 4.89	73.8 ± 5.56
Перья	25.8 ± 11.55	15.9 ± 7.66	11.2 ± 7.00
	22.4 ± 1.15	29.6 ± 10.41	54.2 ± 11.38
Силикагель	21.9 ± 10.40	25.8 ± 13.35	50.1 ± 17.25
	24.9 ± 8.92	19.3 ± 10.54	28.3 ± 11.45

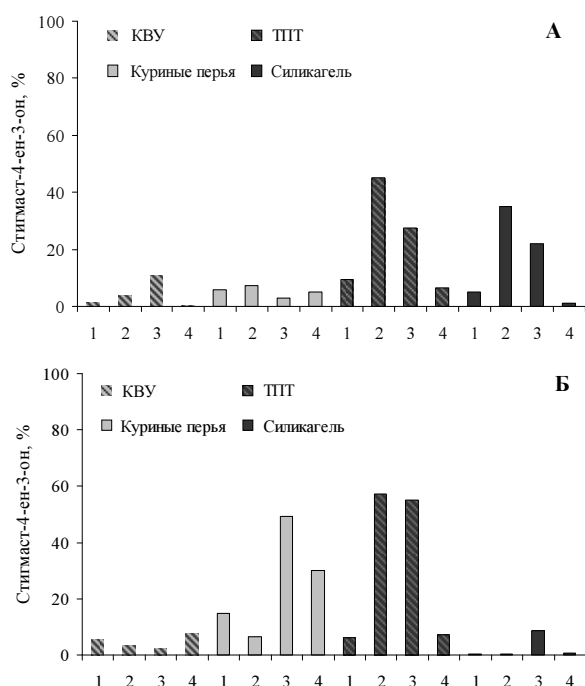


Рис. 1. Биотрансформация β -ситостерола иммобилизованными клетками *R. ruber* ИЭГМ 233 в минеральной среде «К» с добавлением *n*-гексадекана (1) или глюкозы (2), среде D. Wilmańska с соавт. [8] (3), фосфатно-щелочном буфере (4). Бактерии предварительно выращивали в среде D. Wilmańska с соавт. [8] без добавления (А) или с добавлением (Б) 0.2 г/л исходного стерола. Приведены данные после 5 сут биотрансформации β -ситостерола.

Таблица 3

Биотрансформация β -ситостерола клетками *R. ruber* ИЭГМ 233, иммобилизованными на поверхности технической полимерной ткани

Инкубационная среда	Стигмаст-4-ен-3-он, %		
	1	2	3
Минеральная среда «К» с глюкозой	45.3 ± 4.03	57.1 ± 3.50	63.5 ± 5.96
Глюкозосодержащая среда D. Wilmańska с соавт. [8]	27.6 ± 3.11	55.2 ± 4.00	60.5 ± 4.66

Примечание. Для биотрансформации β -ситостерола использовали: иммобилизованные клетки без дополнительной инкубации в присутствии глюкозы и β -ситостерола (1, 2); иммобилизованные клетки, выдержанные в течение 2 сут в глюкозосодержащих средах с добавлением 0.2 г/л β -ситостерола в качестве индуктора (3). До этапа иммобилизации бактерии выращивали в среде D. Wilmańska с соавт. [8] без добавления (1) или с добавлением 0.2 г/л β -ситостерола (2, 3).

В отдельных экспериментах наряду с *R. ruber* ИЭГМ 233 способность к эффективной (44%) трансформации β -ситостерола выявлена также у

клеток *R. ruber* ИЭГМ 220, иммобилизованных на технической полимерной ткани. Установлено, что другие представители рода, использованные в работе, окисляют лишь 2–25% стерола в стигмаст-4-ен-3-он.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что использование в качестве носителя технической полимерной ткани обеспечивает эффективную биотрансформацию β -ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он иммобилизованными клетками родококков. При этом максимальный (более 55%) уровень стеролтрансформирующей активности родококков достигается после культивирования бактерий до этапа иммобилизации в присутствии β -ситостерола в качестве индуктора. Дополнительная инкубация закрепленных на ткани родококков в глюкозосодержащих средах с добавлением β -ситостерола способствует повышению их способности к биотрансформации β -ситостерола до 64%. Среди исследованных штаммов выявлены культуры *R. ruber* ИЭГМ 220 и ИЭГМ 233, которые после иммобилизации на технической полимерной ткани, наиболее активно трансформируют β -ситостерол с образованием стигмаст-4-ен-3-она.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности, инноваций и науки Пермского края (проект № 14-04-96005-р_урал_a).

ЛИТЕРАТУРА

- Martins S. C. S., Martins C. M., Fiúza L. M. C. C., Santaella S. T. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater // *African J. Biotechnol.* 2013. V. 12(28). P. 4412–4418.
- Ившина И. Б., Гришко В. В., Ноговицина Е. М., Кукина Т. П., Толстикова Г. А. Биотрансформация β -ситостерола и его сложных эфиров актинобактериями рода *Rhodococcus* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2005. №6. С. 626–633.
- Ноговицина Е. М., Гришко В. В., Ившина И. Б. Биокаталитическое получение фармакологически перспективного стигмаст-4-ен-3-она с использованием клеток родококков // *Биоорганическая химия.* 2011. №5. С. 697–704.
- Гришко В. В., Ноговицина Е. М., Ившина И. Б. Оптимизация условий биокаталитического получения стигмаст-4-ен-3-она // *Химия природных соединений.* 2012. № 3. 390–392.
- Use of stigmasta-4-en-3-one in the treatment of androgen dependent disease. Pat. 5264428, USA / S.Streber. – Appl. No. 876.131; Filing Date. 29.04.1992.; Publication Date. 23.11.1993.
- Alexander-Lindo R. L., Morrison E. Y. S. A., Nair M. G. Hypoglycaemic Effect of Stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (Cashew) // *Phytother. Res.* 2004. V. 18. P. 403–407.
- Barla A., Birman H., Kültür S., Öksüz S. Secondary metabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity // *Turk. J. Chem.* 2006. V. 30. P. 325–332.
- Wilmańska D., Dziadek J., Sajduda A., Milczarek K., Jaworski A., Murooka Y. Identification of cholesterol oxidase from fast-growing mycobacterial strains and *Rhodococcus* sp. // *J. Ferment. Bioeng.* 1995. V. 79 P. 119–124.

Поступила в редакцию 23.09.2014 г.

THE SEARCH OF OPTIMAL RHODOCOCCI IMMOBILIZATION CARRIERS FOR β -SITOSTEROL BIOTRANSFORMATION

© E. M. Nogovitsina^{1*}, G. A. Bazhutin², V. V. Grishko³

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
Ural Branch of Russian Academy of Sciences
13 Golev St., 614081 Perm, Russia.*

²*Perm State University
15 Bukirev St., 614990 Perm, Russia.*

³*Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
3 Akademika Koroleva St., 614013 Perm, Russia.*

Phone: +7 (342) 280 81 14.

*Email: nogov@iegm.ru

The genus *Rhodococcus* actinobacteria deposited in the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (official acronym IEGM, World Federation for Culture Collections #768, www.iegm.ru/iegmcol) were used in the researches of β -sitosterol biotransformation process by bacterial cells immobilized on the different solid carriers. It was shown that the level of the β -sitosterol transforming activity of rhodococci has no direct dependence on the degree of bacterial adsorption on the carriers. It was found that *R. ruber* IEGM 233 cells efficiently (to 94%) adsorbed on the surface of catalytic carbon fiber after the immobilization oxidized no more than 5% β -sitosterol to produce a pharmacologically active compound stigmast-4-en-3-one. Optimal conditions of β -sitosterol oxidative biotransformation by rhodococci cells fixed on technical polymer fabric were determined. It was found that the level of β -sitosterol transforming ability by *Rhodococcus* strains immobilized on this carrier varied from 2 to 64%. *R. ruber* IEGM 220 and IEGM 233 bacterial cultures catalyzing oxidative biotransformation of β -sitosterol to stigmast-4-en-3-one most efficiently (more than 40%) were selected.

Keywords: biotransformation, genus *Rhodococcus* actinobacteria, immobilization, β -sitosterol, stigmast-4-en-3-one.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Martins S. C. S., Martins C. M., Fiúza L. M. C. C., Santaella S. T. African J. Biotechnol. 2013. Vol. 12(28). Pp. 4412–4418.
2. Ivshina I. B., Grishko V. V., Nogovitsina E. M., Kukina T. P., Tolstikov G. A. Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya. 2005. No. 6. Pp. 626–633.
3. Nogovitsina E. M., Grishko V. V., Ivshina I. B. Bioorganicheskaya khimiya. 2011. No. 5. Pp. 697–704.
4. Grishko V. V., Nogovitsina E. M., Ivshina I. B. Khimiya prirodnykh soedinenii. 2012. No. 3. 390–392.
5. Use of stigmast-4-en-3-one in the treatment of androgen dependent disease. Rat. 5264428, USA / S.Streber. – Appl. No. 876.131; Filing Date. 29.04.1992.; Publication Date. 23.11.1993.
6. Alexander-Lindo R. L., Morrison E. Y. S. A., Nair M. G. Phytother. Res. 2004. Vol. 18. Pp. 403–407.
7. Barla A., Birman H., Kültür S., Öksüz S. Turk. J. Chem. 2006. Vol. 30. Pp. 325–332.
8. Wilmańska D., Dziadek J., Sajduda A., Milczarek K., Jaworski A., Murooka Y. J. Ferment. Bioeng. 1995. Vol. 79 Pp. 119–124.

Received 23.09.2014.