

УДК 547.92, 579.873.2

ПОЛУЧЕНИЕ 3,17-ДИКЕТОСТЕРОИДОВ ИЗ СОЕВЫХ СТЕРИНОВ С ПОМОЩЬЮ АКТИНОБАКТЕРИЙ *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex* И *Rhodococcus erythropolis*

© 2011 г. В. А. Андрияшина*, Н. В. Родина*, Т. С. Стыщенко*, Лью Дук Хи**, А. В. Дружинина*, В. В. Ядерец*, Н. Е. Войшвилло*

*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312
e-mail: andryushina@rambler.ru

**Институт химии, Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой

Поступила в редакцию 14.04.2010 г.

Конвертировали соевые стеринны (СС) в андрост-4-ен-3,17-дион (АД), андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) и 9 α -гидрокси-АД (9-ОН-АД) с помощью трех штаммов актинобактерий. Найдены условия получения АД с помощью *Mycobacterium neoaurum* из 30 г/л СС. Стерины вносили в среду в виде микрокристаллов, либо в комплексе с метил- β -циклодекстрином (МЦД). Через 144 ч трансформации содержание АД в культуральной жидкости достигало 14.5 и 15.2 г/л соответственно. АД, полученный в присутствии МЦД, трансформировали (не выделяя из культуральной жидкости), в АДД с помощью *Pimelobacter simplex* или в 9-ОН-АД с помощью *Rhodococcus erythropolis*. Через 3 ч 1,2-дегидрирования в реакционной смеси содержалось 13.5 г/л АДД, который был выделен с выходом 75% с примесью 1.25% АД и 1.5% 1,2-дегидротестостерона. В контрольном опыте – 1,2-дегидрирование 20 г/л чистого АД в водном растворе с МЦД заканчивалось через 4 ч без образования побочных продуктов. Продукт, полученный через 22 ч 9 α -гидроксилирования АД, содержал по данным ВЭЖХ 80% 9-ОН-АД и 1.5% АД, отделение которого от гидроксистероида не представляло трудностей в отличие от опытов с АДД. Выход 9-ОН-АД с т.пл. 218–220°C в пересчете на СС составил 56%.

Базовыми структурами для синтеза многих лекарственных препаратов стероидной природы [1–4] являются 3,17-дикетостероиды – андрост-4-ен-3,17-дион (АД), андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) и 9 α -гидроксиандростендион (9-ОН-АД), образуемые в результате селективного отщепления боковой цепи стериннов бактериями.

Указанные соединения получают главным образом с помощью мутантных штаммов бактерий рода *Mycobacterium* (*M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. phlei*, *M. roseum*, *M. vaccae*), у которых блокирован синтез ферментов, отвечающих за деградацию стероидных колец [5–9]. Сообщается также о способности к селективному отщеплению боковой цепи стериннов бактериями *Arthrobacter globiformis*, *A. oxydans*, *A. simplex*, *Micrococcus roseus*, *Rhodococcus equi*, *Lactobacillus bulgaricus* [10–15]. Максимальное содержание трансформируемых стериннов достигает 30 г/л. При такой нагрузке период полной биоconversion стериннов в АД составляет более 300 ч [5, 6].

Условия трансформации стериннов в АДД существенно отличаются от условий ферментации АД-образующими штаммами вследствие токсичности АДД для бактерий при содержании в среде более 0.6–1.0 г/л [16, 17]. Эффект ингибирования процесса продуктом трансформации устраняют, выводя АДД из сферы реакции адсорбцией его на органических смолах, либо применяя циклодекстри-

ны, образующие с ним комплексы включения [4, 9, 18].

Имеются данные получения АДД трансформацией стериннов в 2 стадии (в количестве не выше 10 г/л) с использованием двух различных культур [19, 20]. В работе [19] на первой стадии фитостерин трансформировали в АД с помощью культуры *Mycobacterium* sp., затем с помощью гриба *Fusarium solani* АД дегидрировали в АДД. Однако в любом варианте кроме АДД в реакционной среде оставался промежуточный продукт трансформации – АД, присутствие которого вследствие очень близкой к АДД химической структуры усложняло стадию выделения последнего в чистом виде.

Так же, как и АДД, 9-ОН-АД получают либо непосредственно из стериннов (иногда в присутствии адсорбентов), либо из АД [1–4, 21–25]. Конверсия АД в 9-ОН-АД наиболее эффективно осуществляется мутантными штаммами микроорганизмов, у которых заблокирован синтез 3-кетостероид-1,2-дегидрогеназы [21, 25]. Например, двойной мутант *Rhodococcus erythropolis* RG8 с высокой скоростью конвертирует 92–96% АД в 9-ОН-АД при нагрузке субстрата до 20 г/л [25].

Цель работы – получение АД из фитостериннов с помощью *Mycobacterium neoaurum* при нагрузке стериннов в среде не менее 30 г/л и трансформирование его без выделения из культуральной жидко-

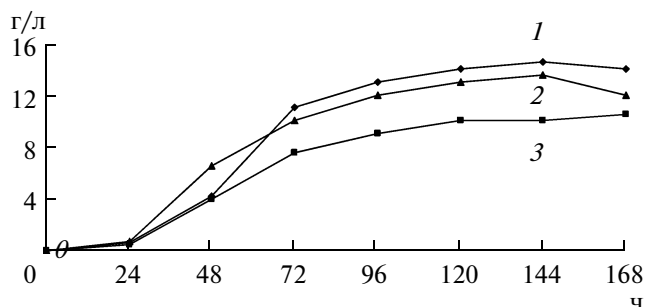


Рис. 1. Влияние количества посевного материала на образование АД из СС при нагрузке 30 г/л: 1 – 30% (дробное внесение), 2 – 30% (одноразовое внесение), 3 – 20%.

сти в АДД и 9 α -ОН-АД с помощью *Pimelobacter simplex* и *Rhodococcus erythropolis* соответственно.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы. Использовали штаммы: *Mycobacterium neoaurum* Ас-1634, расщепляющий боковую цепь стерина животного и растительного происхождения с образованием АД [26], *Pimelobacter simplex* Ас-1632, осуществляющий 1,2-дегидрирование Δ^4 -3-кетостероидов [27] и *Rhodococcus erythropolis* Ас-1740, выполняющий 9 α -гидроксилирование Δ^4 -3-кетостероидов [28], депонированные в Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Среды и условия культивирования. Актинобактерии хранили на агаровых средах, в состав которых кроме агара входили: для *M. neoaurum* (г/л): глюкоза – 10.0, соевая мука – 5.0, лимонная кислота – 2.2, мочевины – 0.5, NH_4Cl – 1.0, K_2HPO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.05, CaCO_3 – 1.5, pH 6.8–7.0; для *P. simplex* и *R. erythropolis* (г/л): глюкоза – 10.0, кукурузный экстракт – 15.0, K_2HPO_4 – 1.0, pH 6.8–7.2. Посевной материал (1 стадия культивирования) готовили в 100 мл этих сред (без агара) в конических колбах объемом 750 мл и выращивали 65–68 ч. Для 2 стадии – трансформации стерина в АД с помощью *Mycobacterium neoaurum* – культивирование бактерии осуществляли в таких же колбах, но снабженных отбойником, в среде, содержащей (г/л): глюкоза – 20.0, соевая мука 18%-ной жирности – 5.0, лимонная кислота – 2.2, мочевины – 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.05, CaCO_3 – 3.0, соевые стерин (СС) с размером частиц 5–15 мкм – 20.0 (или 30.0), pH 7.0–7.2. При использовании СС в количестве 30 г/л раствор глюкозы и посевной материал подавали дробно (в начале эксперимента в количестве 10%, через 48 ч – 10%, через 96 ч – 10%. Глюкозу в 0 ч – 2%, через 48 ч – 1.5%, через 96 ч – 1.5%). Потребление

глюкозы определяли, используя глюкозо-оксидазный метод [26].

Условия биотрансформации. Смесь СС, состоящую из (%): ситостерин – 38, стигмастерин – 29, кампестерин – 18, насыщенные стеринны – 1.5, вносили в виде мелкокристаллической суспензии (размер частиц 5–15 мкм) в количестве 20–30 г/л в указанную выше среду.

Для трансформации АД в АДД или в 9-ОН-АД соответственно с помощью *P. simplex* и *R. erythropolis* в суспензию СС добавляли метил- β -циклодекстрин (МЦД) в мольном отношении 1 : 1 (МЦД/АД), предполагая полную конверсию СС в АД. Процессы культивирования и трансформации проводили на качалке при 30 $^\circ\text{C}$ и скорости перемешивания 220 об/мин.

Биомассу *R. erythropolis* для 2 стадии трансформации выращивали 24–26 ч и осаждали декантацией в холодильнике в течение 1 сут. Влажную биомассу в количестве, соответствующем весу 0.4–0.5 г сухого вещества, переносили в колбы с 100 мл культуральной жидкости, полученной через 140–145 ч трансформации СС с помощью *M. neoaurum*.

Для получения АДД из АД использовали замороженную биомассу *P. simplex*, приготовленную согласно [27].

Оценка количества продуктов трансформации. Количество АД, АДД и 9-ОН-АД в культуральной жидкости оценивали с помощью ТСХ и ВЭЖХ. Стероиды извлекали экстракцией этилацетатом. Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil (“Imid Ltd”, Россия) и систему бензол–ацетон 3 : 1. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе “Gilson”, США, колонка с Silasorb С-18 (4.0 \times 250 мм), зернение 10 мкм. Скорость потока 0.8 мл/мин. Подвижная фаза $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (70 : 30).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение АД из СС с помощью *M. neoaurum*. Конверсия СС в АД культурой *M. neoaurum* при нагрузке субстрата 30 г/л показана на рис. 1. Так же, как при трансформации СС в количестве 10–20 г/л [26], появление АД зафиксировано уже в лаг-фазе, которая заканчивалась через 20–22 ч после инокуляции. Наиболее активно бактерия трансформировала СС в фазе экспоненциального роста и, как видно из рис. 1, скорость накопления АД определялась плотностью посевного материала – $2.7-3.0 \times 10^{10}$ или $4.2-4.5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл, что соответствовало одноразовым дозам инокулята 20 и 30 об. %. Максимальный выход АД наблюдали при дробном внесении посевного материала – первая порция 20 об. %, вторая – 10 об. % через 48 ч ($1.2-1.4 \times 10^{10}$ КОЕ/мл). Одновременно с второй порцией инокулята подавали дополнительно глюкозу, которая при начальной (одноразовой) дозе инокулята 30 об. % через 48 ч была полностью исчерпана

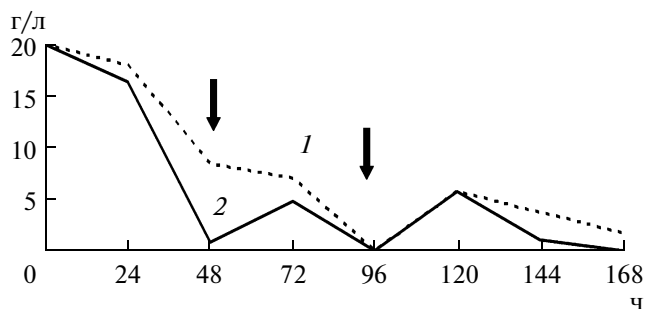


Рис. 2. Динамика потребления глюкозы в процессе трансформации СС с нагрузкой 30 г/л. Стрелки указывают время внесения дополнительной порции глюкозы. Посевной материал: 1 – 20%, 2 – 30%.

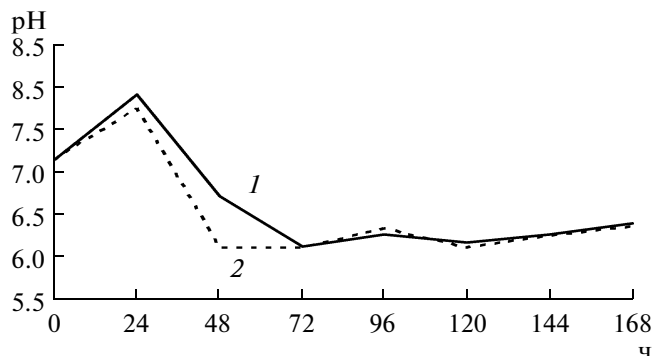


Рис. 3. Изменение pH культуральной жидкости в процессе трансформации СС с помощью *M. neoaurum*. Посевной материал: 1 – 20%, 2 – 30%.

(рис. 2). На рис.1 видно, что стероидтрансформирующая активность культуры *M. neoaurum* резко возрастала в результате добавления через 48 ч свежей порции инокулята в количестве 10 об. %.

Для периода максимальной стероидтрансформирующей активности культуры и интенсивного потребления глюкозы (первые 72 ч ферментации) была характерна тенденция к изменению pH с 7.5 до 6.0–6.2 (рис. 3). Следующий период (72–144 ч) характеризовался замедлением накопления АД, несмотря на вторую дополнительную порцию глюкозы через 96 ч. Значение pH в этом периоде оставалось на постоянном уровне – около 6.3. В отличие от контроля (20 об. % посевного материала и дополнительная порция глюкозы 2% через 48 ч), в котором через 144 ч было получено 10 г/л АД, в опыте с дробным внесением инокулята (в сумме 30 об. %) и добавлением 2 порций глюкозы (по 1.5%) через каждые 48 ч трансформации мелкокристаллического СС, содержание АД через 144 ч достигло 14.5 г/л (70% от теор.).

Получение АДД и 9-ОН-АД без выделения АД из культуральной жидкости (КЖ). В процессе трансформации СС в виде микрокристаллической суспензии АД накапливался в КЖ в виде крупных кристаллов, размер которых был несоизмерим с размером клеток актинобактерии [26]. Поэтому для проведения второй стадии превращения АД в АДД или в 9-ОН-АД без выделения АД из КЖ процесс его получения проводили в присутствии метил-β-циклодекстрина, который образовывал во-

дорастворимый комплекс с АД. Трансформация СС при нагрузке 30 г/л в АД была проведена в условиях, оптимальных для конверсии микрокристаллического субстрата, т.е. дробное внесение 30 об. % инокулята и глюкозы. Содержание АД в виде комплекса с МЦД через 6 сут составило 15.2 г/л.

Получение АДД. Данные конверсии АД в АДД с помощью *P. simplex* приведены в таблице. Полученный указанным выше способом АД в виде комплекса с МЦД был трансформирован в течение 3 ч в АДД. Выход выделенного технического продукта, содержащего 1.2% АД и 1.5% 1,2-дегидротестостерона (таблица) в пересчете на СС, составил 75%. Присутствие в конечном продукте АД и 1,2-дегидротестостерона – продукта восстановления АДД в КЖ *M. neoaurum* – было, по-видимому, связано с недостаточной аэрацией реакционной смеси, содержащей плотную биомассу двух культур. Контрольный опыт (получение АДД из 20 г/л субстрата, содержащего 98% АД, растворенного в воде с помощью МЦД и подвергнутого 1,2-дегидрированию с помощью меньшего количества биомассы *P. simplex*) заканчивался без образования побочных продуктов.

Получение 9-ОН-АД. Стадию превращения АД в 9-ОН-АД осуществляли с помощью биомассы штамма *R. erythropolis* с высокой 9α-гидроксилазной активностью по отношению к Δ⁴-3-кетостероидам и низкой деструктивной активностью в отношении стероидного ядра. В работе [28] было пока-

Получение АДД с помощью *P. simplex* из АД в КЖ *M. neoaurum* через 140 ч трансформации СС (I) или из АД в виде водного раствора комплекса АД 98%-ного содержания с МЦД (II, контроль)

Реакционная среда	Содержание АД, г/л	Биомасса <i>P. simplex</i> , г/л	Время трансформации, ч	Содержание стероидов в кристаллическом продукте, %		
				АДД	дегидротестостерон	АД
I	15.0	8.0	3	90	1.5	1.2
II	20.0	6.0	4	95	следы	следы

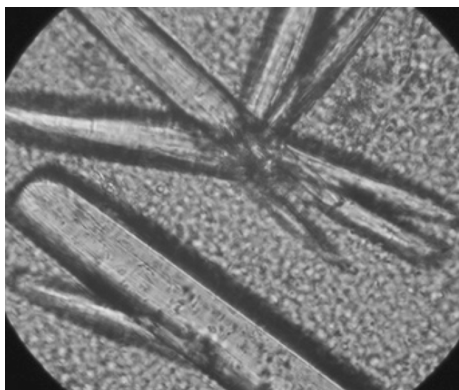


Рис. 4. Кристаллы 9-ОН-АД в КЖ *Rhodococcus erythropolis*.

зано, что указанная актинобактерия конвертирует микронизированный АД при содержании в среде в количестве 10–15 г/л (в присутствии диметилформамида) в течение 48 ч, образуя крупные кристаллы 9-ОН-АД, недоступные для дальнейшей модификации (рис. 4). В результате 22 ч трансформации 15 г/л АД с помощью этого штамма в смешанной культуре с *M. neoaurum* получен кристаллический продукт, содержащий по данным ВЭЖХ 80% 9 α -ОН-АД и 1.5% не вступившего в реакцию АД. Выход 9-ОН-АД с т. пл. 218–220°C в пересчете на трансформируемые СС составил 56%.

Таким образом, способ получения 9-ОН-АД из стеринов с помощью последовательно используемых двух культур актинобактерий, осуществляющих соответственно отщепление боковой цепи фитостеринов с образованием АД и его 9 α -гидроксигидрирование, можно рассматривать как эффективную альтернативу способам трансформации стеринов одной культурой. В то же время АДД, в отличие от 9-ОН-АД, более целесообразно получать введением 1,2-двойной связи в АД, выделенный из КЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sedlaczek L. // CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1988. V. 7. № 3. P. 187–236.
- Mahato S.B., Garai S. // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
- Донова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 41 № 1. С. 1–14.
- Wovcha M.G., Biggs C.B. Патент США. 1982. № 4345029.
- Wovcha M.G., Biggs C.B. Патент США. 1982. № 4345030.
- Bokany J., Albrecht K., Ambrus G., Lang T., Szabo I.M. Патент США. 1991. № 5004695.
- Rutijowska-Galewicz A., Ziolkowski A., Korycka-Machala M., Sedlaczek L. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. № 3. P. 237–244.
- Молчанова М.А., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Стыценко Т.С., Родина Н.В., Войшвилло Н.Е. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. № 3. С. 379–384.
- Ahmad S., Roy P.K., Khan A.W., Basu S.K., Johri B.N. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 7. № 5. P. 557–561.
- Naghibi F., Tabatabai-Yazdi M., Noori-Daloi M.R., Faramaz M.A., Farnia F. // J. Sci. Islamic Repub. Iran. 1996. V. 6. № 4. P. 207–210.
- Sarangthem K., Singh L.J., Srivastava R.C. // Indian J. Plant Physiol. 1998. V. 3. № 4. P. 249–252.
- Saganska K., Kazmierczak J., Uszycka-Horawa T. Патент Польши. 1999. № 164535.
- Dogra N., Qazi G.N. // Folia Microbiol. 2001. V. 46. № 1. P. 17–20.
- Kumar R., Dahiya J.S., Singh D., Nigam P. // Bioresour. Technol. 2001. V. 78. № 2. P. 209–211.
- Goswami P.G., Singh H.D., Baruah J.N. // Folia Microbiol. 1984. V. 29. № 3. P. 209–216.
- Perez C., Falero A., Llanes N., Hung B.R., Herve M.E., Palmero A., Marti E. // J. Basic Microbiol. 2003. V. 43. № 2. P. 113–120.
- Gottschaldt B., Grosse H.H., Horhold C., Wetzker M., Naumann H., Heller I., Birke M., Plonka G. Патент Германии. 1993. № 301740.
- Kutney J.P., Herrington E.J., Spassov G. Междунар. Патент. 2003. № WO 03/064674.
- Lee C.J., Chen C.D., Liu W.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 38. № 4. P. 447–452.
- Marsheck W.J., Jui J., Wang P.G. Патент США. 1983. № 4397947.
- Jekkel B.A., Albrecht K., Ambrus G., Lang T., Szabo I.M., Ilkoy E., Konczol K., Moravesik I., Hantos G., Csajagi E. Патент США. 1991. № 5004695.
- Atrat P.G., Koch B., Szekalla B., Horhold-Schubert C. // J. Basic Microbiol. 1992. V. 32. № 3. P. 147–157.
- Angelova B., Mutafov S., Avramova T., Dimova I., Boyadjieva L. // Process Biochem. 1996. V. 31. № 2. P. 179–184.
- Geize R. van der, Hessels G. Патент Австралии. 2001. № 775476.
- Родина Н.В., Молчанова М.А., Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 56–62.
- Дружинина А.В., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 642–646.
- Родина Н.В., Андриюшина В.В., Стыценко Т.С., Турова Т.П., Баслеров Р.В., Пантелеева А.Н., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 439–445.

Conversion of Soybean Sterols into 3,17-Diketosteroids Using Actinobacteria *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex*, and *Rhodococcus erythropolis*

V. A. Andryushina^a, N. V. Rodina^a, T. S. Stytsenko^a, Luu Duc Huy^b, A. V. Druzhinina^a,
V. V. Yaderetz^a, and N. E. Voishvillo^a

^a Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 177312, Russia
e-mail: Andryushina@rambler.ru

^b Laboratory of Steroids, Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Science and Technology, Hanoi, 7/1, Vietnam
Received April 14, 2010

Abstract—Soybean sterols were converted into androst-4-ene-3,17-dione (AD) and 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (9-OH-AD) using three actinobacterium strains. The transformation of a microcrystalline substrate (particle size 5–15 nm) or the transformation in the presence of randomly methylated β -cyclodextrin (MCD) were carried out by *Mycobacterium neoaurum* with a phytosterol load of 30 g/l over 144 h with an AD content of 14.5 and 15.2 g/l, respectively. AD obtained in the presence of MCD was transformed into ADD (13.5 g/l) by *Pimelobacter simplex* cells over 3 h and into 9-OH-AD by *Rhodococcus erythropolis* cells after 22 h without the isolation of AD from the cultural liquid. The technical product ADD was obtained in 75% yield, based on phytosterol. It contained as impurity 1.25% of AD and 1.5% of 1,2-dehydrotestosterone. In a control experiment—the process of 1,2-dehydrogenation of 20 g/l AD in the water solution of MCD—no by products were isolated. Thus, it is more expedient to introduce the 1,2-double bond into pure AD, whereas *R. erythropolis* strain with low destructive activity towards steroid nucleus can be used in the mixed culture with *M. neoaurum*. The crystal product contained, according to HPLC, 80% of 9-OH-AD, and 1.5 AD was combined. The yield of 9-OH-AD (m.p. 218–220°C) based on transformed phytosterol was 56%.