

УДК 579.222.4

**БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ
АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА *RHODOCOCCUS*****П.Ю. Мальцева^{1,2}, Н.А. Плотницкая^{1,2}, А.А. Чудинова², И.В.Ильина³,
Н.Ф. Салахутдинов³, И.Б. Ившина^{1,2}**¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия³Новосибирский институт органической химии имени академика Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

Проведена оценка способности штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus sensu stricto* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmc.ru>) к биотрансформации растительных монотерпеноидов (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, обладающий наибольшей целевой каталитической активностью. Конверсия монотерпеноидов сопровождалась реакциями гидроксирования, карбоксилирования и дегидратации с образованием карвона, дигидрокарвона, 10-гидрокси- и 10-карбокси-производных (–)-изопулегола и ряда неидентифицированных соединений. *In silico* анализ полученных производных показал, что полученные метаболиты с высокой степенью вероятности могут проявлять антигельминтную, противоэксземную, ветрогонную, противоопухолевую и иммуносупрессивную активность, а также использоваться в качестве респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы. Начаты исследования, направленные на идентификацию путей трансформации монотерпеноидов и определение функциональных генов и кодируемых ими ферментов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования родококков для трансформации монотерпеноидов с целью получения новых биологически активных соединений.

Ключевые слова: актиномицеты, биологически активные вещества, биотрансформация, растительные монотерпеноиды, (–)-изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол, (–)-L-карвон, *Rhodococcus*.

Введение. Поиск новых соединений с выраженной биологической активностью, а также новых катализаторов и инновационных технологий, основанных на использовании микроорганизмов, является актуальной проблемой, связанной с недостатком терапевтических средств в отдельных разделах медицины (сердечно-сосудистые, опухолевые, нейродегенеративные заболевания, заболевания иммунной системы и др.). Значительный интерес в качестве субстратов для получения производных с выраженной антимикробной, противопаразитарной, антиоксидантной, противовоспалительной и противоопухолевой активностью представляют монотерпеноиды (–)-изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол и (–)-L-карвон [1,4–6]. Одной из успешно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные актиномицеты рода *Rhodococcus*. Родококки способны катализировать широкий спектр стерео- и региоселективных реакций и могут быть использованы в качестве эффективных биокатализаторов процессов трансформации растительных три-, ди- и монотерпеноидов [3].

Цель настоящей работы – оценка способности коллекционных штаммов родококков к биотрансформации растительных монотерпеноидов (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона.

Материалы и методы. В работе использовали 60 штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmcoll.ru/strains>), обладающих выраженной каталитической активностью в отношении сложных гидрофобных субстратов.

Реакции трансформации монотерпеноидов осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, содержащих 20 мл минеральной среды RS, г/л: K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,02, $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – 0,001, в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере при 160 об/мин и температуре 28°C в течение 7 сут. В среду дополнительно вносили дрожжевой экстракт (0,1 г/л) и микроэлементы по Постгейту (0,1 об. %). (–)-Изопулегол, (–)-*транс*-карвеол, (–)-*цис*-карвеол и (–)-L-карвон использовали в концентрации 0,025 об. %. В отдельных экспериментах применяли специфические ингибиторы цитохром P450-зависимых оксигеназ (метирапон, кетоконазол) в концентрации 0,1–1,0 мМ.

Для получения отдельных клеточных фракций, родококки, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ, трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,0). Клетки гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания) при амплитуде 10 мкм в течение 45 мин в условиях охлаждения. Клеточный гомогенат центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин для получения цитоплазматических ферментов. Солюбилизацию мембраносвязанных ферментов проводили путём ресуспендирования осадка в 100 мл 1%-ого раствора Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере (pH 7,0) и перемешивания на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Полученную смесь центрифугировали и собирали супернатант с экстрагируемыми мембраносвязанными ферментами. Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной, ресуспендировали в 100 мл фосфатного буфера (pH 7,0). Для качественного и количественного анализа остаточных монотерпеноидов и их метаболитов использовали методы тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) соответственно. *In silico* анализ монотерпеноидов проводили с помощью онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) и программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США). Полное секвенирование генома штамма-биотрансформатора проводили с использованием секвенатора MiSeq (Illumina, США). Аннотирование и биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили с использованием сервиса RAST.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного скрининга отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий высокоэффективную трансформацию всех исследованных соединений (рис. 1).

При этом биоконверсия (–)-изопулегола (1) сопровождалась реакциями гидроксирования и карбоксилирования с образованием 10-гидрокси- (2) и 10-карбокси- (3) производных. Биотрансформация (–)-*транс*- (4) и (–)-*цис*-карвеола (7) протекала иначе и включала реакции дегидрирования исходных субстратов до карвона (5) и вещества с m/z 150, предположительно представляющего собой изомерный карвону кетон, соответственно. Последующее гидрирование карвона (5) позволило получить дигидрокарвон (6) и два неидентифицированных метаболита с m/z 166 и m/z 150. У штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 выявлены обширные каталитические возможности, о чем свидетельствует разнообразие катализируемых реакций в отношении структурно схожих соединений. По результатам *in silico* анализа, полученные производные (–)-изопулегола, а также один из продуктов трансформации

(-)-*цис*-карвеола, дигидрокарвон, обладали меньшей степенью гидрофобности и экотоксичности по сравнению с исходными соединениями.

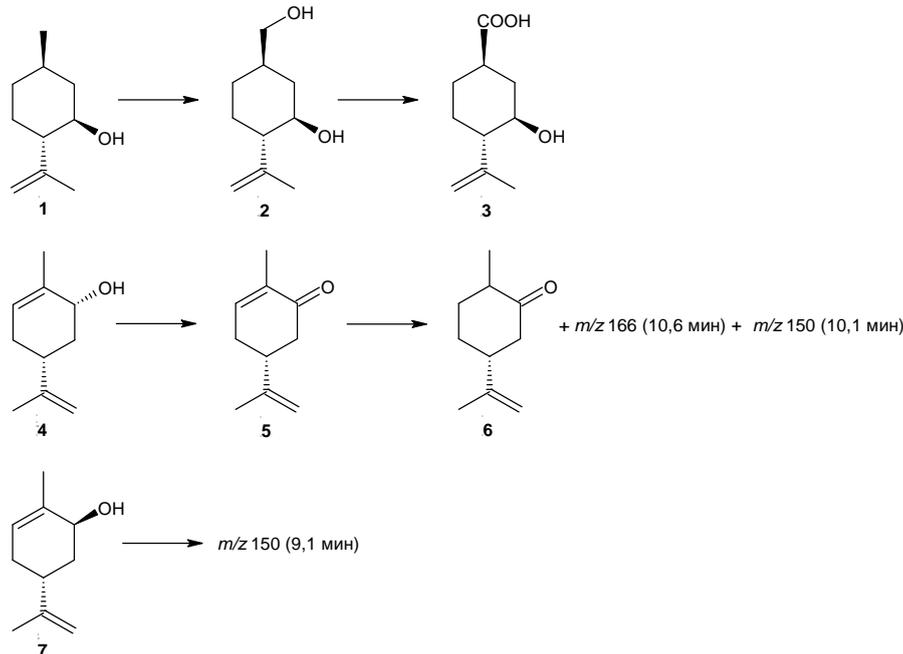


Рисунок 1. Схема биотрансформации монотерпеноидов клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: **1** – (-)-изопулегол, **2** – 10-гидрокси(-)-изопулегол, **3** – 10-карбоксии(-)-изопулегол, **4** – (-)-*транс*-карвеол, **5** – (-)-L-карвон, **6** – дигидрокарвон, **7** – (-)-*цис*-карвеол

Все полученные производные характеризуются большим потенциалом биологической активности и с высокой степенью вероятности могут проявлять антигельминтную, ветрогонную, иммуносупрессивную, противоопухолевую, противоэксземную активность, а также выступать в роли респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы (табл. 1).

Таблица 1

Предполагаемая биологическая активность монотерпеноидов и их производных

Предполагаемая активность, P_a	(-)-изопулегол 1	10-гидрокси(-)-изопулегол 2	10-карбоксии(-)-изопулегол 3	(-)- <i>транс</i> -, (-)- <i>цис</i> -карвеол 4, 7	(-)-L-карвон 5	дигидрокарвон 6
Аналептическая	0,534	0,470	0,560	0,768	0,599	0,558
Антигельминтная (Нематоды)	0,692	0,663	0,594	0,687	0,737	0,562
Ветрогонная	0,976	0,930	0,928	0,973	0,638	0,961
Иммуносупрессивная	0,755	0,720	0,731	0,773	0,657	0,768
Ингибитор бета-глюкуронидазы	–	0,670	0,714	0,650	0,613	0,646
Отхаркивающее средство	0,484	0,425	0,446	0,789	0,654	0,423
Противоопухолевая	–	0,550	0,482	0,870	0,772	0,776
Противоэксземная	0,929	0,918	0,908	0,911	0,737	0,889
Респираторный аналептик	–	0,568	0,686	0,864	0,577	0,520

Логичным развитием исследований в области биотехнологии является определение участвующих в процессах трансформации ферментов и кодирующих их функциональных генов [2]. С использованием отдельных клеточных фракций родококков и специфических ингибиторов оксигеназ на примере (–)-изопулегола показано, что в превращениях задействованы ферменты, локализованные в цитоплазме. На основе известных литературных данных и анализа катализируемых *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 реакций биотрансформации сделан вывод о том, что в преобразовании монотерпеноидов с высокой долей вероятности участвуют ферменты семейства CYP450. В результате проведенного биоинформатического анализа результатов полного секвенирования генома штамма-биотрансформатора было выявлено 9 генов, кодирующих данные ферменты. С использованием ПЦР подобраны оптимальные условия их детекции в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362. Полученные сведения создают предпосылки для дальнейшего исследования уровней экспрессии выявленных генов с целью определения участвующих в процессах трансформации монотерпеноидов ферментов и кодирующих их функциональных генов.

Заключение. По результатам проведенного исследования отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, способный к эффективной биотрансформации (–)-изопулегола, (–)-*транс*-карвеола, (–)-*цис*-карвеола и (–)-L-карвона. Установлено, что превращения данных монотерпеноидов сопровождаются образованием гидроксильированных, карбоксилированных и дегидрированных производных. По данным проведенного компьютерного прогнозирования на основе взаимосвязи “структура-активность”, полученные метаболиты менее токсичны по сравнению с исходным субстратом и могут быть использованы в качестве стимуляторов дыхания, противоопухолевых, противопаразитарных, иммуносупрессивных, ветрогонных препаратов, а также средств для лечения кожных заболеваний. Начаты исследования по идентификации полученных неизвестных продуктов трансформации и определению функциональных генов биоконверсии монотерпеноидов. Полученные данные расширяют представление о биокаталитическом потенциале *Rhodococcus* и свидетельствуют о перспективности их использования для биотрансформации растительных монотерпеноидов с целью получения новых биологически активных соединений.

Благодарности. Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20015.

Библиографический список

1. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene // *Food Chem.* 2006. V. 95. P. 413–422.
2. de Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R. Biotransformations // *Compr. Biotechnol.* Second Ed. 2011. V. 2. P. 451–460.
3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *In Microbial Resources*; ed. by I. Kurtboke. – Elsevier, 2017. P. 121–148.
4. Le T.M., Szakonyi Z. Enantiomeric Isopulegol as the chiral pool in the total synthesis of bioactive agents // *Chem. Rec.* 2022. V. 22. P. 1–32.
5. Serafim C.A.L., Araruna M.E.C., Alves Júnior E.B. et al. (–)-Carveol prevents gastric ulcers *via* cytoprotective, antioxidant, antisecretory and immunoregulatory mechanisms in animal models // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 1–17.
6. Zielińska-Błajet M., Feder-Kubis J. Monoterpenes and their derivatives—recent development in biological and medical applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1–38.