

КАСКАДНАЯ БИОКОНВЕРСИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН  
ШТАММАМИ *MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM* ВКМ Ас-1815Д  
И *NOCARDIOIDES SIMPLEX* ВКМ Ас-2033Д© 2022 г. Д. Н. Текучева<sup>а</sup>, \*, В. В. Фокина<sup>а</sup>, В. М. Николаева<sup>а</sup>,  
А. А. Шутов<sup>а</sup>, М. В. Карпов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ  
“Пуцинский научный центр биологических исследований РАН”, Пуцино, 142290 Россия

\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 24.01.2022 г.

Принята к публикации 25.01.2022 г.

Разработаны методы получения тестостерона на основе двухэтапной трансформации фитостерина при использовании культур актинобактерий *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *Nocardioi-des simplex* ВКМ Ас-2033Д. Эффективное окисление боковой цепи фитостерина культурой *M. neo-aurum* приводило к образованию основного и побочного продуктов: андрост-4-ен-3,20-диона (АД) и андроста-1,4-диен-3,20-диона (АДД) соответственно, которые затем превращались клетками штамма *N. simplex* в тестостерон. 17β-Восстановление является обратимой реакцией и катализируется мембрано-ассоциированной 17β-гидроксистероиддегидрогеназой (17β-ГСД), способной как к окислению, так и восстановлению 17-оксо-группы АД(Д). Обнаружено, что добавки глюкозы и ограниченная аэрация являются ключевыми факторами, которые обеспечивают сдвиг активности 17β-ГСД *N. simplex* в сторону восстановительной реакции. Получение тестостерона из фитостерина реализовано с использованием двух подходов: 1) при инактивации клеток *M. neoaurum* после конверсии фитостерина на первом этапе и применении покоящихся клеток *N. simplex* для восстановления АД(Д) на втором этапе; 2) при последовательном применении двух растущих культур. В оптимизированных условиях общий выход тестостерона из фитостерина (10 г/л) достигал 53 мол. %. Полученные результаты по каскадной биоконверсии фитостерина в тестостерон превосходят известные данные и являются научно-практической основой для разработки новых биотехнологий получения ценных стероидных соединений – интермедиатов синтеза современных лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** каскадная биотрансформация, тестостерон, фитостерин, актинобактерии, *Mycolicibacterium neoaurum*, *Nocardioi-des simplex*

DOI: 10.31857/S0026365622300097

Тестостерон (андрост-4-ен-17β-ол-3-он) – андрогенный стероидный гормон, агонист андрогеновых рецепторов. Тестостерон широко используется в медицине и ветеринарии, а также применяется в качестве важного предшественника при получении некоторых фармацевтических препаратов. Прямой химический синтез тестостерона затруднен из-за сложного строения и асимметричности тетрациклической структуры стероидного ядра. В настоящее время тестостерон производится химически или с применением энзиматических методов из АД (Perez et al., 2006). Применение в медицине химически синтезированного тестостерона может вызывать побочные реакции (Sood et al., 2016).

Наиболее перспективным способом производства тестостерона является его биотехнологи-

ческое получение из дешевого и доступного фитостерина в силу экологичности и экономической привлекательности способа. Фитостерин представляет собой смесь растительных стеренов; получают фитостерин из отходов производства масложировой или целлюлозно-бумажной промышленности (Donova et al., 2005a). Попытки создания прямого биотехнологического метода трансформации фитостерина в тестостерон были предприняты с использованием культур *Mycobacterium* sp. (Lo et al., 2002), *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1815Д и *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1816Д (Egorova et al., 2009). Однако в указанных исследованиях при использовании относительно невысоких концентраций фитостерина (0.1–5 г/л) выход тестостерона составлял 31–55% (мол.).

Следует отметить, что на основании результатов полногеномного секвенирования и филогенетического анализа (Bragin et al., 2013; Shtratnikova et al., 2014) штаммы ВКМ Ас-1815Д и ВКМ Ас-1816Д были определены до вида *M. neoaurum*, а в 2018 г. филогенетически связанная группа микробактерий, включавшая сапрофитные быстрорастущие штаммы данного вида, была реклассифицирована в род *Mycolicibacterium* (Gupta et al., 2018). Таким образом, современное название штаммов ВКМ Ас-1815Д и ВКМ Ас-1816Д – *Mycolicibacterium neoaurum*.

Штамм *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д способен продуцировать АД в качестве основного продукта из фитостерина, поскольку у него блокирована активность ключевого фермента деструкции стероидного ядра – 3-кетостероид-9 $\alpha$ -гидроксилазы и снижена активность 3-оксостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназы при эффективном функционировании ферментов окисления алифатической боковой цепи фитостерина при С17 (Bragin et al., 2013). Дальнейшее восстановление 17-кето-группы АД с образованием тестостерона можно осуществлять с использованием штамма *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д (Sukhodolskaya et al., 2017).

Одной из основных проблем в достижении высокой эффективности биотрансформации стероидов является их низкая доступность для микробных клеток из-за чрезвычайно малой растворимости в воде (Goetschel, Var, 1992). Частичное решение проблемы достигается путем применения смешивающихся с водой органических растворителей и детергентов (Sharma et al., 2012; Shao et al., 2016; Fernandez-Cabezón et al., 2017). Другим подходом является использование циклических олигосахаридов – циклодекстринов и, главным образом, их химически модифицированных производных, таких как метилированный  $\beta$ -циклодекстрин (МЦД), которые обеспечивают более высокую растворимость липофильных соединений даже при их высоких концентрациях. Повышение эффективности биоконверсии в присутствии МЦД было продемонстрировано при трансформации стероидов различными актинобактериями (Donova et al., 2007; Shen et al., 2011); а также для процессов восстановления АД до тестостерона с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Singer et al., 1991) и мутантного штамма *Mycobacterium* sp. Et1 (Egogova et al., 2009); восстановления АД до 1(2)-дегидротестостерона при последовательном использовании двух культур: *Arthrobacter simplex* СРСС 140451 и *Pichia pastoris* GS115 (Tang et al., 2019a), а также для других процессов биотрансформации стероидов.

Ранее было описано несколько каскадных микробиологических процессов биотрансформации стероидов. Например, биотрансформация холестерина в АДД осуществлялась путем поэтапного

применения штаммов *A. simplex* U-S-A-18 (= *Rhodococcus equi* USA-18; Yeh et al., 2014) и *Mycobacterium* sp. NRRLB-3683 (Lee et al., 1993). Нами был разработан эффективный способ получения 11 $\alpha$ -гидрокси-АД из фитостерина, основанный на окислении фитостерина бактериальным штаммом *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д до АД и его последующем селективном 11 $\alpha$ -гидроксилировании штаммом гриба *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-830 в одном биореакторе (Dobnyia et al., 2017). Недавно был описан двухстадийный метод получения 1(2)-дегидротестостерона из АД, предусматривающий 1(2)-дегидрирование АД клетками *A. simplex* СРСС 140451, инактивацию бактериальных клеток и последующее 17 $\beta$ -восстановление образующегося АДД рекомбинантным штаммом дрожжей *P. pastoris* GS115 до 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019a). Другой метод получения 1(2)-дегидротестостерона, разработанный этими же авторами, основан на двухступенчатой биоконверсии фитостерина мутантными штаммами *M. neoaurum* ТССС 11028 и *P. pastoris* GS115, у которых были сверхэкспрессированы гены 3-оксостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназы и 17 $\beta$ -ГСД соответственно (Tang et al., 2019b).

В настоящей работе мы исследовали возможность каскадного микробиологического получения тестостерона из фитостерина с использованием штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д. Трансформацию фитостерина указанными штаммами проводили как 1) последовательно, с инактивацией клеток *M. neoaurum* после завершения первого этапа и последующим внесением покоящихся клеток *N. simplex* на втором этапе; 2) без инактивации миколицибактерий и внесением *N. simplex* непосредственно в ростовую среду. Предложены подходы, способствующие эффективному получению тестостерона при высоких нагрузках фитостерина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы: фитостерин с общим содержанием стероидов 95.47% (“Jiangsu Fruit Biological Products Co., Ltd.”, Китай); андростендион (АД), андростатиендион (АДД), тестостерон и 1(2)-дегидротестостерон (“Steraloids”, США); НАД, НАД(Н) и  $\alpha, \alpha$ -дипиридил (“Merk”, Германия); дрожжевой экстракт (“Difco”, США); соевый пептон (“Hi Media”, Индия); МЦД (“Wacker Chemie”, Германия). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации х.ч. или ч.д.а.

**Микроорганизмы.** Штаммы *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ВКМ).

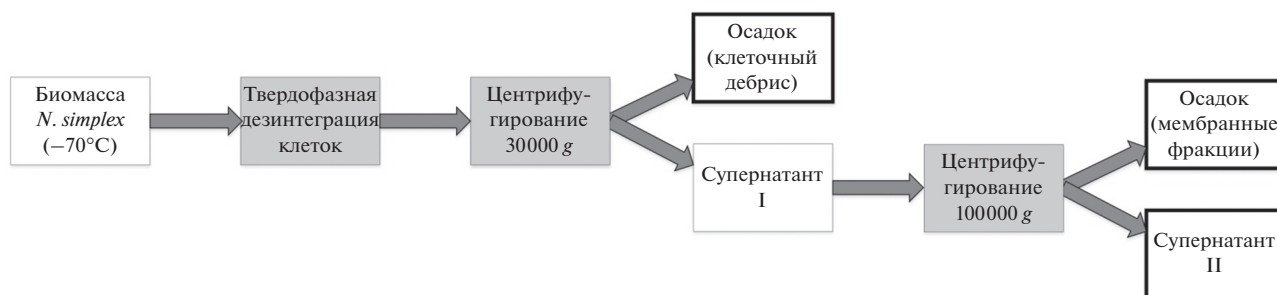


Рис. 1. Схема фракционирования биомассы *N. simplex*.

**Культивирование штаммов.** Культуры *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д выращивали при 30°C в течение 48 ч. Для культивирования *M. neoaurum* использовали среду следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 0.5;  $KH_2PO_4$  – 0.5;  $(NH_4)_2HPO_4$  – 1.5; глицерин – 10.0; дрожжевой экстракт – 10.0. Среда для культивирования *N. simplex* включала (г/л):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 4.0;  $KH_2PO_4$  – 2.0; дрожжевой экстракт – 6.0; соевый пептон – 6.0; глюкоза – 15.0. В обеих средах использовали дистиллированную воду и минеральные соли (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.2;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.005;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.002; pH доводили до 7.0–7.2 до стерилизации. Штаммы выращивали в аэробных условиях в орбитальном шейкере-инкубаторе при 200 об./мин и 30°C.

**Определение внутриклеточной локализации и активности 17β-ГСД *N. simplex in vitro*.** Для экспериментов *in vitro* замороженные при –70°C клетки *N. simplex* разрушали на Фрэнч-прессе (при 10.3 МПа) и суспендировали в 40 мл 50 мМ Трис-НСl с 1мМ ЭДТА, pH 8 (Буфер А). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием в течение 2 ч при 30000 g, 4°C. Мембранные фракции получали центрифугированием супернатанта в течение 3 ч при 100000 g, 4°C. Мембранные фракции ресуспендировали в 40 мл буфера А и повторно центрифугировали (рис. 1).

**Оценку активности полученных фракций** в отношении АД и АДД проводили в присутствии НАД(Н); тестостерона – в присутствии НАД. Реакцию проводили в смеси: 100 мМ буфер Трис-НСl (pH 7.0); 100 мМ NaCl; 1.4 мМ НАДН или НАД (указано в тексте), 120 мМ субстрата; 500 мкл полученных активных клеточных фракций; 2 мл дистиллированной воды при 30°C, в течение 15 ч в микроаэрофильных (без перемешивания) или аэробных условиях (при перемешивании на орбитальном шейкере при 120 об./мин). Стероиды экстрагировали этилацетатом, экстракт упаривали, а затем ресуспендировали в этиловом спирте для анализа методом ТСХ.

**Биоконверсия АД и АДД культурой *N. simplex*.** Штамм *N. simplex* культивировали, как описано ра-

нее (Sukhodolskaya et al., 2017), затем клетки осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 30 мин, 4°C) и вносили в количестве 8 г/л (с.б.) в 0.02 М Na-фосфатный буфер (pH 7.0), добавляли 20 г/л глюкозы и 2 г/л АД или АДД, растворенных в диметилсульфоксиде (ДМСО) (4% об.). Инкубирование проводили при 30°C в микроаэрофильных условиях (в колбах объемом 100 мл, содержащих 50 мл итоговой смеси (соотношение газовой и жидкой фаз – 1 : 1) при слабом перемешивании (70 об./мин).

**Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон.** Трансформацию фитостерина (10 г/л) штаммом *M. neoaurum* проводили на среде для миколицибактерий (Egorova et al., 2002), как описано ранее (Bragin et al., 2013), в присутствии МЦД при мольном соотношении фитостерин–МЦД от 1 : 0.8 до 1 : 1.6.

По завершении трансформации фитостерина в АД (определяли методом ТСХ) 50 мл культуры *M. neoaurum* (подход 1) инактивировали путем прогревания при 50°C в течение 20 мин, переносили в колбы объемом 100 мл, затем вносили дополнительные компоненты (г/л): глюкозу (20), осажденные (4000 g, 30 мин, 4°C) клетки *N. simplex* (4–36 г с.б./л (указано в тексте)). В отдельных экспериментах добавляли α,α-дипиридил (4 мг/л), метанол (0.5–4%, об.), диметилформамид (1–4%, об.), ДМСО (2–8%, об.). Начальный pH среды составлял 7–8 (отмечено в тексте).

При реализации подхода 2 инактивацию *M. neoaurum* не проводили, а переносили 25 мл культуральной жидкости с клетками миколицибактерий в колбу объемом 100 мл, содержащую 25 мл культуры *N. simplex* (8 г/л, с.б.) в стационарной фазе роста (48 ч) в ростовой среде, добавляли глюкозу (20 г/л) или глицерин (10 г/л), α,α-дипиридил (4 мг/л), ДМСО (4%, об.); pH смеси доводили до 8. Трансформацию проводили при 30°C в микроаэрофильных условиях (в колбах объемом 100 мл, содержащих 50 мл культуральной смеси (объемное соотношение газовой и жидкой фаз – 1 : 1) при слабом перемешивании (100 об./мин).

**Таблица 1.** Биоконверсия АД, АДД и тестостерона в присутствии коферментов НАД(Н) или НАД соответственно клеточным дебрисом *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д в аэробных и микроаэрофильных условиях

| Субстрат и кофактор                          | Продукты биоконверсии и их выход, мол. % |          |             |                         |
|--|--|----------|-------------|-------------------------|
|  | АД                                       | АДД      | тестостерон | 1(2)-дегидротестостерон |
| Микроаэрофильные условия (без перемешивания) |  |          |             |                         |
| АД + НАД(Н)                                  | –  | 21 ± 5.4 | 23 ± 1.9    | 10 ± 2.1                |
| АДД + НАД(Н)                                 | 10 ± 2.3                                 | –        | 7 ± 1.1     | 27 ± 3.7                |
| Тестостерон + НАД                            | 15 ± 5.6                                 | 12 ± 4.3 | –           | 19 ± 3.1                |
| Аэробные условия (орбитальный шейкер)        |  |          |             |                         |
| Тестостерон + НАД                            | 40 ± 4.2                                 | 24 ± 2.7 | –           | 9 ± 0.9                 |

**Определение веса сухой биомассы.** Перед вторым центрифугированием клетки *N. simplex* отмывали от остатков среды 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.0, осаждали центрифугированием при 4000 g, 30 мин при 4°C и высушивали при 105°C до постоянного веса.

**Стероиды анализировали** с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано ранее (Lobastova et al., 2021).

**Воспроизводимость результатов и статистические тесты.** Эксперименты проводили в трех независимых повторностях, на основании которых рассчитывалась величина стандартного отклонения, отображенная на графиках и в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

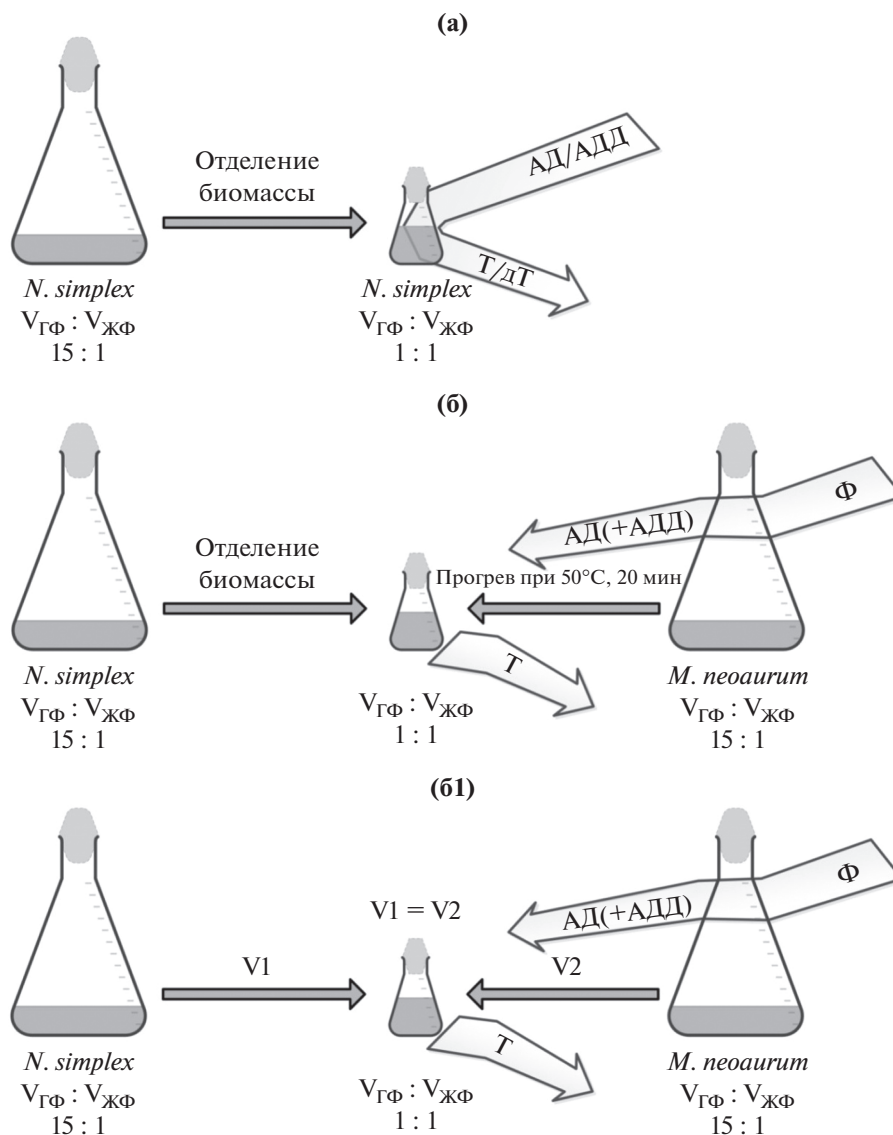
**Изучение 17β-гидроксистероиддегидрогеназной активности (17-ГСД) штамма *N. simplex in vitro*.** Клеточные фракции *N. simplex*, полученные как описано в разделе Материалы и методы (рис. 1), тестировали на активность в отношении C<sub>19</sub>-стероидов в аэробных или микроаэрофильных условиях. 17-ГСД-ферментативную активность наблюдали только во фракции клеточного дебриса. В микроаэрофильных условиях и в присутствии НАД(Н) АД и АДД конвертировались в тестостерон и 1(2)-дегидротестостерон соответственно. Кроме этого, регистрировали образование АДД из АД, что свидетельствует о наличии 3-оксостероид-Δ<sup>1</sup>-дегидрогеназной активности. Наблюдали и обратную реакцию гидрирования C1–C2-двойной связи, то есть превращение АДД в АД (табл. 1). Продуктами превращения тестостерона в микроаэрофильных условиях были 1(2)-дегидротестостерон, АД и АДД (табл. 1). Таким образом, в микроаэрофильных условиях реакции 17β-восстановления и 1(2)-гидрирования протекали параллельно с 1(2)-дегидрированием.

Скорость ферментативного НАД(Н)-зависимого восстановления 17-кетогрупп АД и АДД за счет 17β-ГСД-активности была практически одинаковой, а общий выход 17β-восстановленных производных (тестостерон и 1(2)-дегидротестостерон) составлял 33 и 34% из АД и АДД соответственно (табл. 1). Таким образом, эксперименты *in vitro* подтвердили, что эффективное восстановление 17-кетогруппы 3,17-дикетоандростанов клетками *N. simplex* возможно только в восстановительных условиях.

Большинство 17β-ГСД могут катализировать обратимые окислительно-восстановительные реакции, но активность бактериальных ферментов, как правило, смещена в сторону окисления гидроксильной группы при C17, тогда как 17β-ГСД грибов предпочтительно катализируют восстановление C17-карбонильных групп (Donova et al., 2005b; Fernandez-Cabezón et al., 2017).

Об обратимом окислении двойной связи C1–C2 стероидного ядра сообщалось ранее (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2002). Также известно, что микробиологическое восстановление АДД до тестостерона, при котором происходит восстановление как двойной связи C1–C2, так и восстановление C17-кетогруппы, часто протекает более эффективно, чем восстановление только C17-кетогруппы АД (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2009). Это было показано также для штаммов рода *Nocardia* (Sharma et al., 2012) и подтверждается для *N. simplex* (табл. 1). Для эффективного восстановления 17-кетогруппы необходим высокий уровень НАД(Н) (Fogal et al., 2010).

Таким образом, для эффективного восстановления карбонильной группы при C17 3,17-дикетоандростанов штаммом *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д необходимы восстановительные условия – снижение концентрации растворенного кислорода и обеспечение пула восстановительных кофакторов (НАД(Н)).



**Рис. 2.** Схема проведения экспериментов, в которых (а) экзогенные химически чистые АД и АДД трансформируются осажденными клетками *N. simplex*; (б) каскадная биотрансформация 10 г/л фитостерина в тестостерон осуществляется с применением инактивированной культуральной жидкости *M. neoaurum* и осажденных клеток *N. simplex* или (б1) неинактивированной культуры *M. neoaurum* и культуры *N. simplex*. Обозначения: Φ – фитостерин, Т – тестостерон, дТ – 1(2)-дегидротестостерон,  $V_{GF}$  – объем газовой фазы,  $V_{ZF}$  – объем жидкой фазы,  $V_1$ ,  $V_2$  – объемы культур *M. neoaurum* и *N. simplex*.

Дальнейшие эксперименты проводили *in vivo* в присутствии 20 г/л глюкозы в микроаэрофильных условиях, которые создавали добавлением большой биомассы осажденных клеток штамма *N. simplex*, использованием слабого перемешивания и сокращения объема газовой фазы.

**Биотрансформация АД и АДД штаммом *N. simplex in vivo*.** В модельных экспериментах изучали особенности трансформации экзогенных химически чистых АД и АДД клетками *N. simplex* (рис. 2а и 3). Это исследование было необходимо для подтверждения возможности применения каскадной схемы, в которой культура *N. simplex* вносится в

содержащую АД(+АДД) культуральную жидкость, полученную в ходе трансформации фитостерина штаммом *M. neoaurum*.

В вышеуказанных условиях АДД почти полностью трансформировался клетками *N. simplex* в 1(2)-дегидротестостерон в течение 72 ч (рис. 3а). Биотрансформация АД в тестостерон активно протекала только в первые часы инкубирования, накопление тестостерона достигало  $40.8 \pm 2.7$  мол. % за 8 ч конверсии (рис. 3б, кривая 4), затем наблюдалось обратное окисление тестостерона до АД (рис. 3б, кривые 3 и 4). Известно, что в клетках микроорганизмов активность 17β-ГСД зависит от

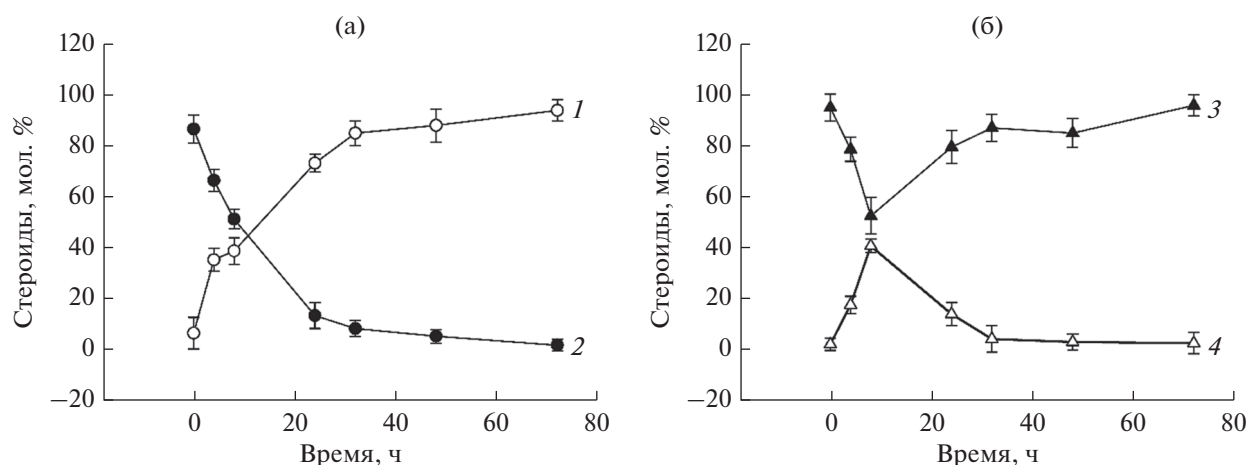


Рис. 3. Биотрансформация 2 г/л АДД (а) и АД (б) клетками *N. simplex* ВКМ-Ас 2033Д (по рис. 2а). Обозначения кривых: 1 – накопление 1(2)-дегидротестостерона; 2 – убыль АДД; 3 – изменение концентрации АД; 4 – изменение концентрации тестостерона.

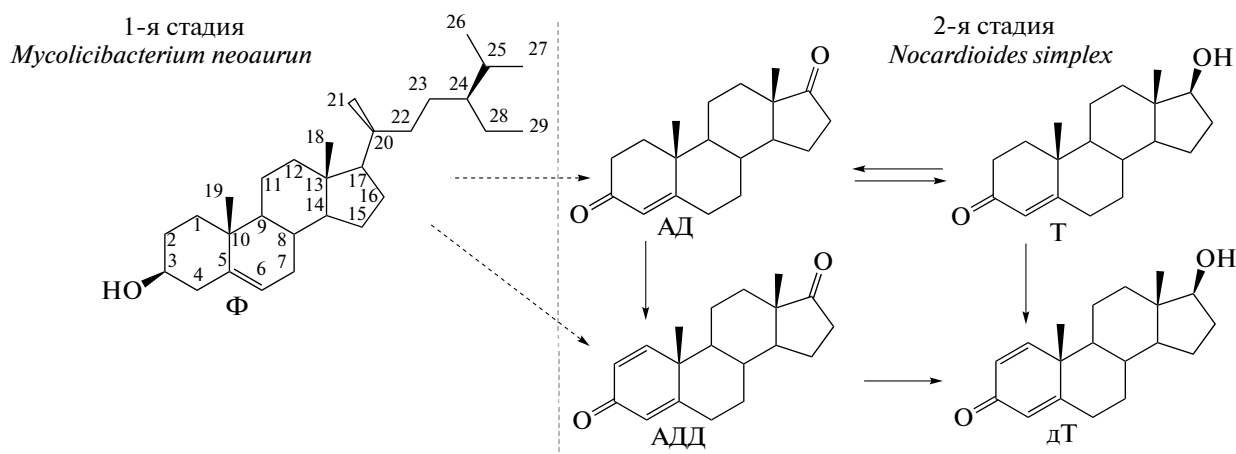


Рис. 4. Схема каскадного получения тестостерона из фитостерина с применением штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д. Обозначения: Ф – фитостерин, Т – тестостерон, дТ – 1(2)-дегидротестостерон.

соотношения концентраций НАД(Н) к НАД (Kristan et al., 2003). Вероятно, истощение пула НАД(Н) при трансформации АД является причиной сдвига  $17\beta$ -ГСД-активности в сторону окисления.

На рециклизацию восстановленной формы НАД может положительно влиять внесение глюкозы. Так, для штаммов *Rhodococcus ruber* Chol-4 и *Lactobacillus bulgaricus* было показано, что нежелательное окисление тестостерона до АД уменьшалось при добавлении глюкозы (Guevara et al., 2019).

Предпочтительное восстановление АДД по сравнению с АД в качестве субстрата для бактериальных  $17\beta$ -ГСД было описано ранее (Singer et al., 1991; Egorova et al., 2009; Shao et al., 2016; Fernandez-Cabezón et al., 2017; Guevara et al., 2019). В некоторых случаях получить тестостерон из АД не

удалось совсем (Hung et al., 1994). Среди возможных причин авторы указывали более высокую токсичность АД для клеток микроорганизмов, а также различия физико-химических характеристик АД и АДД (Fernandes et al., 2003; Egorova et al., 2009).

**Каскадная трансформация фитостерина в тестостерон при инактивировании культуры *M. neoaurum* и последующем внесении осажженных клеток *N. simplex*.** Изучали возможность применения каскадной биотрансформации фитостерина в тестостерон при последовательном использовании культур *M. neoaurum* и *N. simplex*, которые конвертировали фитостерин в АД(+АДД), а затем в тестостерон соответственно (рис. 4).

Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием культуры *M. neoaurum* (рис. 4) с получением 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД. По-



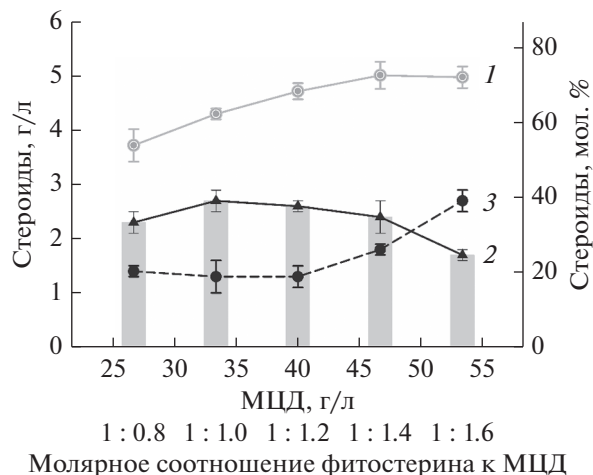
сле прогревания культуры *M. neoaurum* осажденные клетки *N. simplex* ресуспендировали в полученной культуральной жидкости, содержащей АД и АДД. Для оптимизации условий биоконверсии оценивали влияние содержания МЦД, вносимой биомассы *N. simplex*, значения pH, типа и концентрации органических растворителей, ингибитора активности 9 $\alpha$ -гидроксилазы.

**Влияние концентрации МЦД на каскадную биотрансформацию фитостерина.** Как показано на рис. 5, суммарный выход АД и АДД (первая стадия каскадного процесса) увеличивался при повышении концентрации МЦД (кривая 1). Однако максимальный выход тестостерона на второй стадии каскадного процесса незначительно изменялся в диапазоне мольных соотношений фитостерин–МЦД (1 : 0.8–1 : 1.4 (рис. 5, кривая 2)). При оптимальном содержании МЦД выход тестостерона из фитостерина (10 г/л) в варианте с использованием инактивации *M. neoaurum* составлял 35.3–36.7 мол. % (2.6–2.7 г/л).

Как отмечалось выше, циклодекстрины могут оказывать воздействие не только на стероиды, но и на клетки актинобактерий (Donova et al., 2007; Shen et al., 2011). До сих пор не сообщалось об отрицательном влиянии МЦД на миколицибактерии, в то время как в среде с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином потеря как мембранных, так и внутриклеточных белков и липидов клетками *N. simplex* достигала в общей сложности более 40% по сравнению с контролем без применения циклодекстринов (Shen et al., 2011). Было также описано снижение эффективности биотрансформации АД при концентрации циклодекстринов выше оптимальной (Shao et al., 2016; Tang et al., 2019a).

**Влияние количества вносимой биомассы *N. simplex*.** Увеличение содержания осажденных клеток *N. simplex* в 3–9 раз (с 4 до 36 г/л, с.б.) незначительно влияло на выход тестостерона при каскадной биотрансформации фитостерина (данные не представлены). Однако при трансформации АД рекомбинантным штаммом *P. pastoris* GS115 увеличение биомассы в 5–6 раз (до 200 г/л влажной биомассы) повышало выход тестостерона более чем в два раза (Shao et al., 2016). При каскадной трансформации фитостерина рекомбинантными штаммами *M. neoaurum* TCCC 11028 и *P. pastoris* GS115 более высокая биомасса дрожжей (концентрация влажных клеток 175 г/л) обеспечивала максимальную продукцию 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019b).

**Влияние  $\alpha, \alpha$ -дипиридила.** В ходе биотрансформации АД(Д) штаммом *N. simplex* из-за наличия 9 $\alpha$ -гидроксилазной активности, приводящей к разрыву кольца В стероидного ядра 1(2)-дегидрированных производных (Shtratnikova et al., 2021), наблюдали неполный материальный баланс стероидов. Бактериальная 3-оксостероид-9 $\alpha$ -гидрокси-

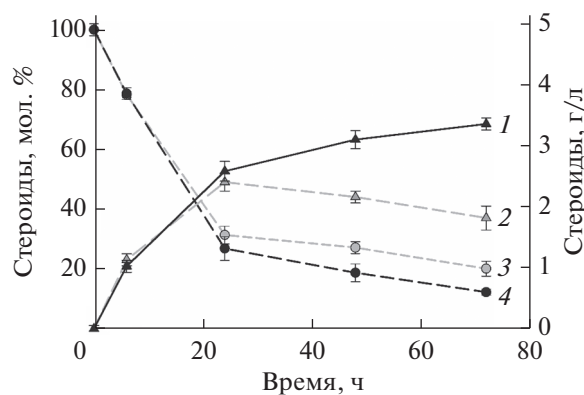


**Рис. 5.** Влияние концентрации МЦД на суммарный выход АД и АДД (1) на стадии биотрансформации 10 г/л фитостерина, осуществляемой *M. neoaurum*, а также на выход тестостерона (2) и содержание остаточного АД (3) на второй стадии каскадной биоконверсии, осуществляемой *N. simplex* (по рис. 26).

лаза состоит из субъединиц KshA (монооксигеназа) и KshB (редуктаза), кодируемых генами *kshA* и *kshB* соответственно. В геноме *N. simplex* выявлено три ортолога гена *kshA* (Shtratnikova et al., 2016), причем транскрипция двух из них увеличивалась при индукции фитостерином. Таким образом, деградация стероидного ядра по 9(10)-секо-пути у *N. simplex*, по-видимому, обеспечивается продуктами генов *kshA* и *kshB* (Shtratnikova et al., 2021).

В данном исследовании концентрация тестостерона не увеличивалась после 24 ч инкубирования *N. simplex* с использованием культуральной жидкости, содержащей АД (рис. 6, кривая 2), в то время как уровень АД (рис. 6, кривая 3), АДД и 1(2)-дегидротестостерона снижался, что может быть связано с разрушением стероидного ядра. Добавление неспецифического ингибитора 9 $\alpha$ -гидроксилазы, —  $\alpha, \alpha$ -дипиридила, увеличивало период накопления тестостерона до 72 ч с увеличением его конечного выхода до 64.5–71.2 мол. % (рис. 6, кривая 1), что свидетельствовало о снижении деструкции стероидов.

**Влияние диметилсульфоксида (ДМСО).** Известно, что органические растворители и детергенты обеспечивают распределение гидрофобных субстратов, таких как стероиды, в водной среде, тем самым обеспечивая более высокую скорость биоконверсии. Например, покоящиеся клетки штамма *A. simplex* (= *N. simplex*) TCCC 11037, обработанные 8% (об.) этанола, проявляли максимальную 1(2)-дегидрогеназную активность (Luo et al., 2014). С другой стороны, органические растворители могут вызывать повреждение клеточных мембран.

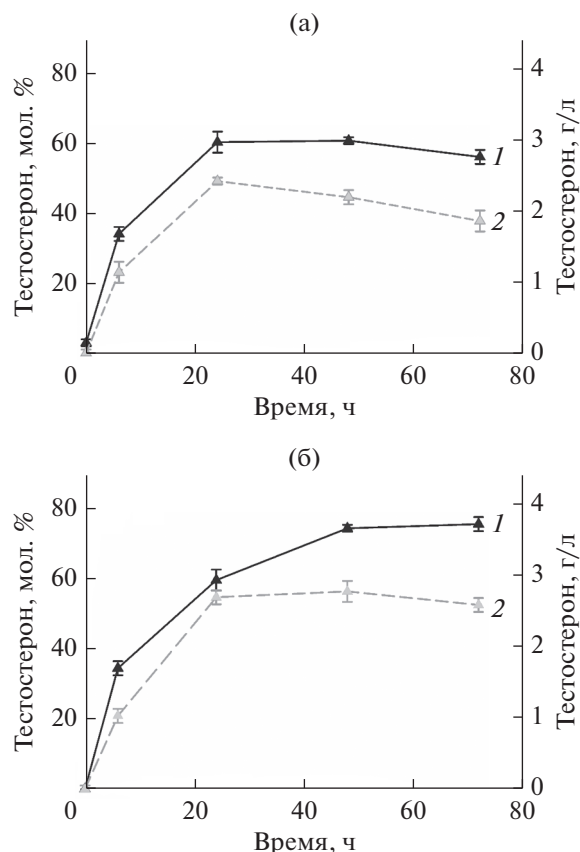


**Рис. 6.** Влияние  $\alpha, \alpha$ -дипиридила на выход тестостерона (1, 2) и остаточную концентрацию АД (3, 4). 1, 4 – дополнительное внесение 0.4 мг  $\alpha, \alpha$ -дипиридила; 2, 3 – без внесения  $\alpha, \alpha$ -дипиридила. Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием штамма *M. neoaurum* (по рис. 2б) с выходом 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД.

ДМСО – малотоксичный биполярный апротонный органический растворитель, который может изменять проницаемость клеточных мембран, облегчая перенос субстратов в клетки при сохранении их жизнеспособности. В наших экспериментах метанол (0.5–4.0%, об.) или диметилформамид (1.0–4.0%, об.) незначительно влияли на образование тестостерона во время второй фазы каскадной биотрансформации. Добавление 4% (об.) ДМСО обеспечивало увеличение выхода тестостерона на 11–13 мол. % (рис. 7а).

**Влияние pH.** Ранее было показано, что pH влияет на биотрансформацию АД в тестостерон актинобактериями (Liu, Lo, 1997; Egorova et al., 2009; Fernandez-Cabezón et al., 2017). В данной работе влияние pH на эффективность второй фазы каскадного превращения фитостерина оценивали в диапазоне pH 7.0–8.0. Восстановление 17-карбонильной группы АД(Д) наиболее активно протекало при pH 8.0 с достижением максимального выхода тестостерона 50.4 мол. % за 48–72 ч. Комбинированный эффект ДМСО (4%, об.) и pH 8.0 заключался в увеличении скорости накопления тестостерона и достижения его концентрации 3.6–3.7 г/л, что соответствует 75.5 мол. % на второй стадии каскадного процесса (АД → тестостерон) (рис. 7б). Выход тестостерона из фитостерина в этом случае составил 51.8–53.2 мол. %.

**Каскадная биотрансформация фитостерина в тестостерон с применением неинaktivированной культуры *M. neoaurum* и клеток *N. simplex* в ростовой среде.** С целью упрощения общей схемы получения тестостерона из фитостерина из нее исключили этапы инактивации культуры *M. neoaurum* и отделения клеток *N. simplex* центрифугированием. При этом клетки *N. simplex* добавляли непосредственно в культуральную жидкость, содержа-



**Рис. 7.** Влияние pH и ДМСО на накопление тестостерона в ходе трансформации АД(+АДД)-богатой инактивированной культуральной жидкости *M. neoaurum* осажденными клетками *N. simplex*. Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием штамма *M. neoaurum* (рис. 2б) с выходом 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД. Начальное значение pH содержащей АД(+АДД) инактивированной культуральной жидкости *M. neoaurum* доводили до (а) 7.0, (б) 8.0. Обозначения кривых: 1 – дополнительно вносили 4% (об.) ДМСО; 2 – ДМСО не вносили.

щую культуру *M. neoaurum* после биоконверсии фитостерина в АД(+АДД) (рис. 2б1).

Биоконверсию 10 г/л фитостерина культурой *M. neoaurum* проводили при молярном соотношении фитостерина к МЦД, равном 1 : 1.6 с получением 4.8 г/л АД. Таким образом, молярное отношение фитостерина к МЦД на второй стадии каскадной биотрансформации составило 1 : 0.8 (за счет двукратного разбавления при добавлении культуры *N. simplex*). Выход тестостерона из 10 г/л фитостерина при реализации этой схемы составил 2.40–2.65 г/л.

В контрольном варианте (без добавления клеток *N. simplex*) накопления тестостерона не наблюдали. Замена глюкозы глицерином на втором этапе полностью изменяла ход биотрансформации: тестостерон не образовывался, а основным стероидным продуктом был АД.



Ранее сообщалось, что при каскадной биотрансформации инактивация культуры, используемой на первом этапе, может положительно влиять на выход целевого продукта. Так, при внесении растущих культур *A. simplex* СРСС 140451 и *P. pastoris* GS115 в один биореактор биотрансформация АД в 1(2)-дегидротестостерон (болденон) была неэффективной, в то время как инактивация культуры *A. simplex* СРСС 140451 после первого этапа каскадной трансформации способствовала увеличению общего выхода 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019a). В другом случае отсутствие этапа инактивации клеток стерилизацией культуральной жидкости при биотрансформации фитостерина культурой *M. neoaurum* МЗМ-ksdDR2 приводило к потере 1(2)-дегидротестостерона на 13% по сравнению с контролем (Tang et al., 2019b).

Использование растущих культур *M. neoaurum* и *N. simplex* имеет практическое преимущество перед применением осажденных клеток *N. simplex* и инактивированной с помощью стерилизации культуральной жидкости *M. neoaurum* в перспективе промышленного получения тестостерона, поскольку позволяет сократить продолжительность каскадной биотрансформации, а также оборудование, энерго- и трудозатраты.

В данной работе были изучены особенности каскадной двуступенчатой биотрансформации фитостерина в тестостерон с использованием двух штаммов актинобактерий – *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, осуществляющими селективную окислительную деградацию боковой цепи фитостерина и 17 $\beta$ -восстановление образующихся андростендионов до тестостерона соответственно.

В экспериментах *in vitro* было показано, что восстановление 17-кетогруппы андростендионов (АД и АДД) наиболее эффективно катализируется мембранно-связанными ферментами в микроаэрофильных условиях в присутствии НАД(Н). В отличие от восстановления АДД до 1(2)-дегидротестостерона, восстановление его 1(2)-насыщенного аналога, АД, в тестостерон с использованием клеток штамма *N. simplex* является обратимым. Для эффективной продукции тестостерона из АД необходимо повышение пула восстановительных эквивалентов, что может быть достигнуто путем добавления глюкозы и создания микроаэрофильных условий. Реализация каскадной биоконверсии фитостерина в тестостерон возможна как с использованием осажденных клеток, так и растущей культуры *N. simplex*. Найденны условия, обеспечивающие выход тестостерона до 53 мол. % при использовании высокой концентрации фитостерина (10 г/л).

Полученные результаты могут быть использованы в качестве основы создания “белой” био-

технологии производства тестостерона из возобновляемых растительных материалов на основе проведения двустадийной микробиологической трансформации фитостерина в одном биореакторе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность к. б. н. Галине Викторовне Суходольской, прежде всего, за идею исследования, а также за неоценимую помощь в выборе и разработке методов, получении и обсуждении результатов и формулировке выводов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-64-00024).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данного исследования не имеют конфликта интересов и выполняли работу в соответствии с научной этикой и законодательством.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Dovbnya D.V., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Malakho S.G., Egorova O.V., Ivashina T.V., Sokolov S.L., Ashapkin V.V., Donova M.V. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 138. P. 41–53.
- Donova M.V., Dovbnya D.V., Sukhodolskaya G.V., Khomutov S.M., Nikolayeva V.M., Kwon I., Han K. Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2005a. V. 80. P. 155–160.
- Donova M.V., Egorova O.V., Nikolayeva V.M. Steroid 17 $\beta$ -reduction by microorganism – a review // Process Biochem. 2005b. V. 40. P. 2253–2262.
- Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin alters core growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria // Microbiology (SGM). 2007. V. 153. P. 1981–1992.
- Dovbnya D., Khomutov S., Kollerov V., Donova M.V. Obtaining of 11 $\alpha$ -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from natural sterols // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology. 2017. V. 1645. P. 259–269.
- Egorova O.V., Gulevskaya S.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Donova M.V. Production of androstenedione using mutants of *Mycobacterium* sp. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2002. V. 77. P. 141–147.
- Egorova O.V., Nikolayeva V.M., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V. Transformation of C 19-steroids and testosterone produc-

- tion by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* spp. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2009. V. 57. P. 198–203.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiroa H.M., Cabral J.M.S. Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. P. 688–705.
- Fernandez-Cabezón L., Galan B., Garcia J.L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fogal S., Motterle R., Castellin A., Arvotti G., Bergantino E. Biocatalyzed synthesis of testosterone // Chem. Eng. Trans. 2010. V. 20. P. 61–66.
- Goetschel R., Bar R. Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids // Enzyme Microb. Technol. 1992. V. 14. P. 462–469.
- Guevara G., Olortegui Flores Y., Fernández de las Heras L., Perera J., Navarro Llorens J.M. Metabolic engineering of *Rhodococcus ruber* Chol-4: A cell factory for testosterone production // PLoS One. 2019. V. 14. e0220492.
- Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 67.
- Hung B., Falero A., Llanes N., Pérez C., Ramirez M.A. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 497–500.
- Kristan K., Rizner T.L., Stojan J., Gerber J.K., Kremmer E., Adamski J. Significance of individual amino acid residues for coenzyme and substrate specificity of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus* // Chem. Biol. Interact. 2003. V. 143–144. P. 493–501.
- Lee C.H., Chen C., Liu W.H. Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 38. P. 447–452.
- Liu W.H., Lo C.K. Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 19. P. 269–272.
- Lo C.K., Pan C.P., Liu W.H. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. P. 280–283.
- Lobastova T., Fokina V., Tarlachkov S., Shutov A., Bragin E., Kazantsev A., Donova M. Steroid metabolism in thermophilic actinobacteria *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *Hirsuta* VKM Ac-666T // Microorganisms. 2021 Dec; 9(12): 2554
- Luo J., Ning J., Wang Y., Cheng Y., Zheng Y., Shen Y., Wang M. The effect of ethanol on cell properties and steroid 1-en-dehydrogenation biotransformation of *Arthrobacter simplex* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2014. V. 61. P. 555–564.
- Perez C., Falero A., Luu Duc H., Balcinde Y., Hung B.R. A very efficient bioconversion of soybean phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria // J. Ind. Microbiol. 2006. V. 33. P. 719–723.
- Shao M., Zhang X., Rao Z., Xu M., Yang T., Li H., Xu Z., Yang S. Efficient testosterone production by engineered *Pichia pastoris* co-expressing human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and *Saccharomyces cerevisiae* glucose 6-phosphate dehydrogenase with NADPH regeneration // Green Chem. 2016. V. 18. P. 1774–1784.
- Sharma P., Slathia P., Somal P., Mehta P. Biotransformation of cholesterol to 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) by *Nocardia* species // Ann. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1651–1659.
- Shen Y., Wang M., Zhang L., Ma Y., Ma B., Zheng Y. Effects of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on cell growth, activity, and integrity of steroid-transforming *Arthrobacter simplex* and *Mycobacterium* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. P. 1995–2003.
- Shtratnikova V., Schelkunov M., Fokina V., Bragin E.Y., Shutov A.A., Donova M.V. Different genome-wide transcriptome responses of *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D to phytosterol and cortisone 21-acetate // BMC Biotechnol. 2021. V. 21. Art. 7.
- Shtratnikova V.Y., Bragin E.Y., Dovbnaya D.V., Pekov Y.A., Schelkunov M.I., Strizhov N.I., Ivashina T.V., Ashapkin V.V., Donova M.V. Complete genome sequence of sterol transforming *Mycobacterium neoaurum* strain VKM 1815D // Genome Announc. 2014. V. 2. P. e01177-13.
- Shtratnikova V.Y., Schelkunov V.I., Fokina V.V., Pekov Y.A., Ivashina T., Donova M.V. Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D // Curr. Genet. 2016. V. 62. P. 643–656.
- Singer Y., Shity H., Bar R. Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part 2. Reduction of androstenedione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 35. P. 731–737.
- Sood U., Singh Y., Shakarad M., Lal R. Highlight on engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 73–75.
- Sukhodolskaya G., Fokina V., Shutov A., Nikolayeva V., Savinova T., Grishin Y., Kazantsev A., Lukashev N., Donova M. Bioconversion of 6-(*N*-methyl-*N*-phenyl)aminomethyl-androstane steroids by *Nocardioides simplex* // Steroids. 2017. V. 118. P. 9–16.
- Tang R., Shen Y., Wang M., Zhou H., Zhao Y. Highly efficient synthesis of boldenone from androst-4-ene-3,17-dione by *Arthrobacter simplex* and *Pichia pastoris* ordered biotransformation // Bioproc. Biosyst. Eng. 2019a. V. 42. P. 933–940.
- Tang R., Shen Y., Xia M., Tu L., Luo J., Geng Y., Gao T., Zhou H., Zhao Y., Wang M. A highly efficient step-wise biotransformation strategy for direct conversion of phytosterol to boldenone // Bioresour. Technol. 2019b. V. 283. P. 242–250.
- Yeh C.-H., Kuo Y.-S., Chang C.-M., Liu W.-H., Sheu M.-L., Meng M. Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase in *Rhodococcus equi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione // Microb. Cell Fact. 2014. V. 13. Art. 130.

## Cascade Biotransformation of Phytosterol to Testosterone by *Mycolicibacterium neoaurum* VKM Ac-1815D and *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D Strains

D. N. Tekucheva<sup>1</sup>, \*, V. V. Fokina<sup>1</sup>, V. M. Nikolaeva<sup>1</sup>, A. A. Shutov<sup>1</sup>, M. V. Karpov<sup>1</sup>, and M. V. Donova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Received December 13, 2021; revised January 24, 2022; accepted January 25, 2022

**Abstract**—New methods for testosterone production from phytosterol were developed based on its cascade two-stage transformation by actinobacteria *Mycolicibacterium neoaurum* VKM Ac-1815D and *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Efficient oxidation of the phytosterol side chain by *M. neoaurum* resulted of androstenediones, which were subsequently converted to testosterone by *N. simplex*. The latter reaction was reversible and catalyzed by the membrane-associated 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) capable of both oxidation and reduction of androstenedione at C17. Addition of glucose and limited aeration were found to be the key factors providing for a shift of the 17 $\beta$ -HSD activity towards reduction in whole *N. simplex* cells. Testosterone production from phytosterol was realized using two approaches: (i) based on *M. neoaurum* cells inactivation after phytosterol conversion and application of the resting *N. simplex* biomass for androstenedione reduction and (ii) based on sequential application of the two living cultures. Under optimized conditions, the total yield of testosterone from phytosterol (10 g/L) reached 53 mol %. The results exceeded those reported so far for cascade phytosterol bioconversion to testosterone and may be used as a basis for development of new biotechnologies for production of the valuable steroid compounds, intermediates in the synthesis of modern medical preparations.

**Keywords:** cascade biotransformation, testosterone, phytosterol, actinobacteria, *Mycolicibacterium neoaurum*, *Nocardioides simplex*