

УДК 547.689.6;579.66;66.081

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРОГЕСТЕРОНА

© 2020 г. О. С. Савинова^{1, *}, А. М. Чулкин¹, Т. С. Савинова², Е. А. Вавилова¹, Д. В. Васина¹, П. Н. Сольев³, Т. В. Фёдорова¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.11.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Получен штамм *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) – продуцент рекомбинантной лакказы А базидиомицета *Trametes hirsuta* 072. Проведена биокаталитическая трансформация прогестерона (ПГ) новым штаммом. Основные продукты биотрансформации: 11 α -гидрокси-ПГ, 11 α -ацетокси-ПГ и 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ. Изучена кинетика сорбции ПГ и основных продуктов его биотрансформации из трансформационной среды с использованием сорбента Macronet MN-200. Показана эффективность применения метода твердофазной экстракции стероидов без предварительного отделения мицелия.

Ключевые слова: *Aspergillus nidulans*, лакказа, *Trametes hirsuta*, твердофазная экстракция, Macronet MN-200, прогестерон, 11 α -гидроксипрогестерон, 11 α -ацетоксипрогестерон, 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерон

DOI: 10.31857/S0555109920030113

Стероидные лекарственные препараты занимают одно из важных мест в терапии большого числа заболеваний (воспалительных, аллергических, гинекологических, онкологических и др.) [1, 2]. Работы по поиску методов трансформации природных стероидных соединений с целью получения новых лекарственных препаратов, а также разработки новых экологически чистых технологий, ведутся учеными на протяжении нескольких десятилетий, однако остаются актуальными и в настоящее время. Одним из наиболее важных и перспективных методов является биотрансформация с применением ферментных систем различных микроорганизмов, в том числе мицелиальных грибов [3]. Применение целых клеток микроорганизма в качестве биокатализатора более предпочтительно, так как исключает необходимость выделения, очистки и стабилизации чистых ферментов [4].

Проблема регионаправленного и стереоселективного микробиологического гидроксирования относится к числу важнейших в химии стероидов [3]. В настоящее время для проведения таких трансформаций штаммы выбираются в результате скрининга.

Одним из часто используемых модельных соединений для изучения направленности гидроксирования стероидов ряда прегнана микроорганизмами является прогестерон (ПГ). ПГ – половой гормон, синтезируемый желтым телом яичника, корой надпочечников, семенными пузырьками и плацентой. 11(α/β)-Гидроксирование стероидов, особенно ПГ, является важным процессом при производстве кортикостероидов. Однако введение кислородной функции в С11 положение химическими методами синтеза трудно осуществимо. 11 α -Гидроксипрогестерон (11 α -гидрокси-ПГ), как и его 11 β -эпимер, обладает ингибирующей активностью в отношении фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы, который окисляет 11-гидроксигруппу в 11-кетогруппу, участвуя таким образом в регуляции электролитного баланса [5].

Биотрансформация ПГ с образованием 11 α -гидрокси-ПГ наиболее изучена с применением грибов *Aspergillus ochraceus* [6]. Наличие 11 α -монооксигеназной активности и способность трансформировать ПГ с образованием 11 α -гидрокси-производного обнаружена также у некоторых штаммов вида *Aspergillus nidulans* [7–9]. Несмотря на то, что грибы *A. nidulans* широко применяются в качестве мо-

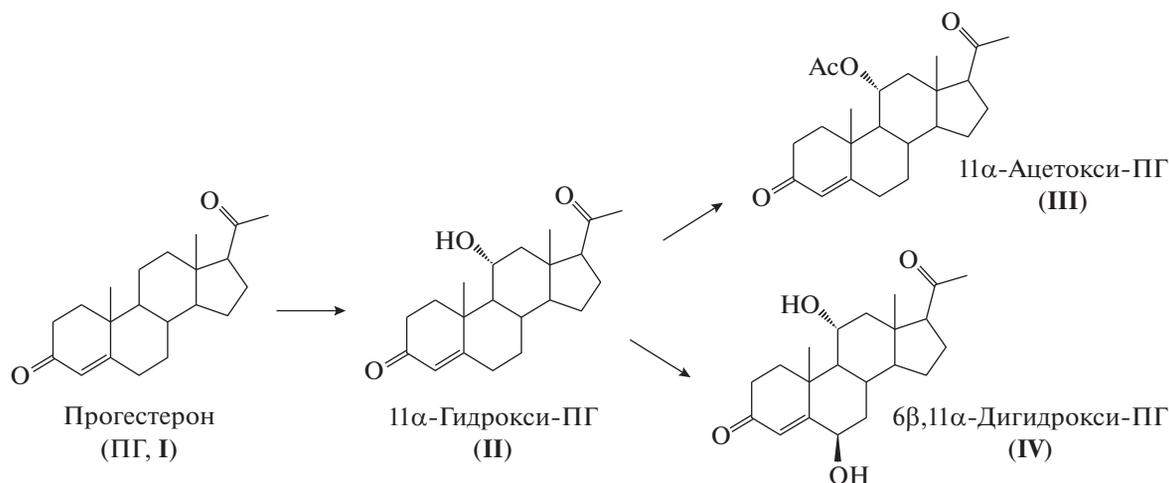


Рис. 1. Схема биотрансформации ПГ штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 [10].

дельного организма в молекулярной биологии и биотехнологии, их способность к трансформации стероидов мало изучена.

Ранее было обнаружено, что штамм дикого типа *A. nidulans* ВКПМ F-1069 способен гидроксилировать ПГ с образованием 11α-гидрокси-ПГ и 6β,11α-дигидрокси-ПГ, а также ацетилировать 11α-гидрокси-ПГ (рис. 1) [10].

Известно, что наличие генетических мутаций в штамме может влиять на его стероид-трансформирующую способность (степень превращения исходного субстрата) и регионаправленность гидроксилирования. Так, в работах [11, 12] было показано, что введение плазмиды pUT 720, несущей устойчивость к блеомицину и содержащей ген *Sh ble*, экспрессируемый под контролем сигналов экспрессии *gpd* и *trpC* *A. nidulans*, изменяло направление гидроксилирования молекулы ПГ грибом *Cochliobolus lunatus* с C11β- на C15α-положение.

В работе [13] показана возможность гидроксилирования некоторых стероидов в органических средах базидиальными лакказами (ЕС 1.10.3.2) [14].

Цель работы — получение нового штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻), способного продуцировать рекомбинантную лакказу А базидиомицета *Trametes hirsuta* 072, оценка влияния генетических изменений в штамме на гидроксилирующую и ацетилирующую способность, а также изучение возможности использования метода твердофазной экстракции (ТФЭ) стероидов из культуральной среды без предварительного отделения мицелия.

МЕТОДИКА

Штаммы. В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов: штамм аскомицета *A. nidulans* 031 (*argB*⁻; *pyrG*⁻) (син. *A. nidulans* (Eidam) G. Winter; AN031; FP-308.1) из кол-

лекции “The CBS-KNAW culture collection”, CBS 129193 (Нидерланды); — ауксотроф штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069 дикого типа (син. FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194), несущий мутации *argB2* и *pyrG89* [15]. Для конструирования плазмиды и бактериальной экспрессии использовали штамм *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США).

Реактивы. Прогестерон (I, ПГ, CAS № 57-83-0, C₂₁H₃₀O₂, М.м. 314.46; “Steraloids Inc.”, США) использовали в качестве исходного субстрата и стандарта. 11α-Гидрокси-прогестерон (II, 11α-гидрокси-ПГ, CAS No. 80-75-1, C₂₁H₃₀O₃, М.м. 330.46; “Steraloids Inc.”, США) и 11α-ацетокси-прогестерон (III, 11α-ацетокси-ПГ, CAS № 2268-98-6, C₂₃H₃₂O₄, М.м. 372.5; “Steraloids Inc.”, США) использовали в качестве стандартов. В качестве сорбента использовали Macronet MN-200 (“Purolite Ltd.”, США).

Неорганические соли — фирмы “Fluka” (Germany) и “Amresco” (США), дрожжевой экстракт и агар — “Difco Vecton Dickinson”, США и “Sparks”, США, диметилсульфоксид 99.0%-ный (ДМСО) — “Serva”, США.

Культивирование. Штаммы *A. nidulans* культивировали поверхностным способом в течение 7–10 сут при 37°C [10] в термостате на агаризованной минимальной питательной среде (ММ) следующего состава (г/л): NaNO₃ — 0.53, D-глюкоза — 10.0, уридин — 1.1, урацил — 1.2, аргинин — 0.21 (при культивировании трансформантов уридин и урацил не добавляли), раствор минеральных солей, описанный в работе [10], — 20 мл/л.

В качестве посевного материала для глубинного культивирования использовали водную суспензию конидий (4 × 10⁷ конидий/100 мл). При глубинном культивировании трансформантов

A. nidulans для оценки активности лакказы использовали жидкую среду ММ с концентрацией глюкозы 20 г/л. Культивирование проводили на орбитальной качалке Brunswick Innova № 44 (“Eppendorf, inc.”, США) в колбах на 750 мл при 240–250 об./мин и 37°C.

Для культивирования грибов с последующей трансформацией ПГ была использована среда СМ [16] следующего состава (г/л): глюкоза – 40; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0; KH_2PO_4 – 0.74; пептон – 1.0; дрожжевой экстракт – 1.0; L-аспарагин – 0.7 с добавлением уридина, урацила и аргинина в зависимости от использованного штамма, как описано выше.

Конструирование плазмиды pGPD-lac1-A.n. Из плазмиды pBGlac [17] с помощью рестрикции по сайтам *AdeI-PaeI* был вырезан фрагмент, содержащий ген *lacA* *Trametes hirsuta* (GeneBank:KP027478); из плазмиды pPCGPDPr с помощью рестрикции по сайтам *KpnI-PscI* был вырезан фрагмент, содержащий последовательность сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*), из плазмиды pPCGNX [17] по сайтам *NcoI-PaeI* был вырезан фрагмент сигнального пептида β-галактозидазы (*BgaS*) *Penicillium canescens*. Полученные фрагменты лигировали в плазмидный вектор pBluescript II KS (+) (“Stratagene”, США), разрезанный по сайтам *KpnI-AdeI*. Полученную лигазную смесь (5 мкл) использовали для трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* XL10 Gold. Правильность сборки плазмидной конструкции проверяли с помощью рестрикционного анализа препаратов плазмидной ДНК по сайтам *AdeI-PaeI* и *KpnI-PaeI*. Правильность стыковки по сайтам *PaeI/NcoI* проверяли секвенированием (“Евроген”, Россия) с помощью олигонуклеотидного праймера: PCGpd_prom_seq CCCTCTCCATCCTCCTCCT.

Трансформация *A. nidulans* плазмидой и отбор клонов. Плазида pGPD-lac1-A.n. была введена в геном *A. nidulans* 031 (*argB2*, *pyrG89*) ко-трансформацией [18] совместно с плазмидой pJR15 [19], несущей ген *pyrG* *A.nidulans*, с отбором на селективной среде ММ, содержащей 0.2 мМ 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевой соли (АБТС) и 0.1 мМ $CuSO_4$.

Определение активности лакказы. Активность лакказы в культуральной жидкости (КЖ) определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (США), как описано в работе [20], с использованием раствора АБТС в качестве хромогенного субстрата. Измерения проводили в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4.5. За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Биотрансформация прогестерона штаммами *A. nidulans*. Водную суспензию конидий готовили смывом с поверхности колоний и по 4×10^7 конидий вносили в качалочные колбы емкостью 750 мл со 100 мл среды СМ. Затем в среду вносили ПГ в виде раствора в ДМСО в концентрации 1.0 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 4% (об.). Культуру выращивали на качалке при 37°C в течение 4 сут. Трансформацию проводили в тех же условиях в течение 66 ч для изучения влияния мутаций и наличия плазмиды и 216 ч для оценки возможности применения метода ТФЭ для извлечения продуктов трансформации без отделения мицелия.

Жидкофазная экстракция (ЖФЭ). Извлечение продуктов трансформации ПГ из культуральной среды проводили через 66 ч от начала биотрансформации. Мицелий отфильтровывали на воронке Бюхнера через полотняный фильтр, промывали дихлорметаном (ДХМ) на фильтре. Фильтрат экстрагировали трижды порциями ДХМ равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали под вакуумом, стероиды из водного остатка экстрагировали ДХМ трижды. Объединенные экстракты фильтрата и мицелия промывали водой, осветляли активированным углем и упаривали в вакууме.

Содержание стероидов в остатке оценивали методом количественной ТСХ на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates (“Merck”, Германия). Хроматографировали дважды в этилацетате (ЭА), продукты визуализировали в УФ-свете (254 нм). Содержание стероидов оценивали с применением программы ImageMaster 2D Platinum v.7 (“GE Healthcare”, Швеция). Пластины опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе $HClO_4$, а затем проявляли, нагревая при температуре 100–120°C.

Выделение индивидуальных соединений I–IV проводили описанным ранее методом [10]. Хроматографическую чистоту подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Изучение кинетики сорбции стероидов. Измерение кинетики сорбции стероидов из водной среды проводили с использованием сорбента Macronet MN-200 в статических условиях. Использовали модельные растворы/суспензии стероидов. Для каждого испытуемого соединения использовали 15 конических колб емкостью 250–300 мл, содержащих по 100 мл дистиллированной воды. В каждую колбу вносили по каплям при перемешивании по 100 мг стероида в растворе ДМСО, подерживая температуру 35–40°C. Конечная концентрация стероида составляла 1.0 г/л, а ДМСО – 4% (об.). Содержимое колб охлаждали при перемешивании до комнатной температуры ($26 \pm 2^\circ C$)

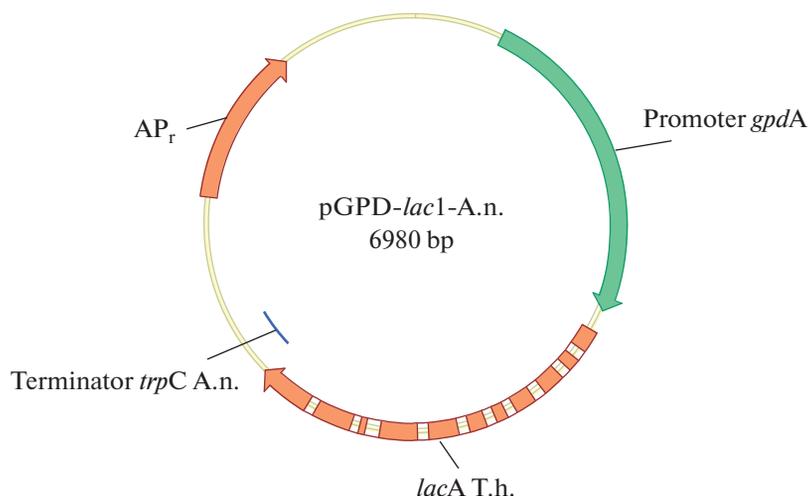


Рис. 2. Карта плазмиды pGPD-*lac1-A. n.*, содержащей ген *lacA*, кодирующий лакказы А гриба *T. hirsuta* 072.

и в каждую колбу помещали капроновый фильтр-пакет с сорбентом Masconet MN-200. Соотношение фаз сорбент : вода составляло 1 : 10 г/об. Фильтр-пакеты готовили из технической капроновой ткани для фильтрации белого цвета и заполняли сухим сорбентом (по 10 г). После приготовления фильтр-пакеты с сорбентом выдерживали в 95%-ном этиловом спирте в течение не менее 3 сут. Перед использованием помещали на 1 ч в стерильную дистиллированную воду.

Процесс сорбции проводили при перемешивании (60–70 об./мин) и температуре 28°C. Через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 48, 72, 96 и 120 ч из каждой колбы извлекали фильтр-пакет с сорбентом, дважды промывали его 20 мл воды от возможных остатков раствора (и/или кристаллов) стероида, водную промывку присоединяли к основной водной фазе. Пакет с сорбентом помещали в колбу на 200–250 мл и добавляли 50 мл ацетона для десорбции стероидного соединения.

Стероид из оставшейся водной фазы экстрагировали этилацетатом трижды по 100 мл. Экстракт упаривали досуха. В остатке определяли содержание стероида с помощью количественной ТСХ.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). Извлечение продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды проводили через 216 ч от начала биотрансформации. В каждую колбу помещали фильтр-пакет с сорбентом. Перемешивали при температуре 28°C на качалке (60–70 об./мин) в течение 24 ч. Затем пакет меняли на другой и продолжали перемешивание еще 48 ч в этих же условиях (операцию повторяли дважды). По окончании сорбции пакеты промывали 20 мл воды каждый. Для контроля полноты сорбции мицелий отфильтровывали, добавляли метанол и выдерживали в условиях ре-мацерации, а фильтр-трат КЖ обрабатывали этилацетатом в условиях примера ЖФЭ.

Десорбция. Десорбцию проводили в динамическом режиме, используя аппарат Сокслета с объемом рабочей зоны экстрактора 100 мл, куда помещали 3 фильтр-пакета с сорбентом. В круглодонную колбу на 250 мл наливали 150 мл ацетона и подключали к аппарату. Процесс проводили при перемешивании. Ацетон нагревали до кипения, экстракцию проводили в течение 4 ч. Затем экстрагировали повторно новой порцией ацетона в течение 1 ч для контроля завершения экстракции. Ацетоновый экстракт упаривали до удаления растворителя. Водный остаток (~30–40 мл) обрабатывали этилацетатом трижды по 45 мл, растворитель упаривали досуха. Контроль полноты десорбции осуществляли методом ТСХ. Полная десорбция завершалась за 4 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияния мутации *argB2* и *pyrG89*, а также плазмиды с геном *lacA*, на процесс биотрансформации ПГ изучали с использованием известного штамма *A. nidulans* 031 (*argB*⁻; *pyrG*⁻) [15] и нового штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻).

Получение штамма *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻). Лакказы – медьсодержащие оксидазы, окисляющие ряд фенольных и нефенольных соединений с сопутствующим восстановлением кислорода до молекулы воды без образования пероксида водорода [14]. Для получения продуцента рекомбинантной LacA в штамме *A. nidulans* была создана плаزمида pGPD-*lac1-A.n* (рис. 2) с геном *lacA* (GeneBank: KP027478) базидиомицета *T. hirsuta* 072, кодирующим LacA (без сигнального пептида лакказы), под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*) с сигнальным пептидом β-галактозидазы *P. canescens*.

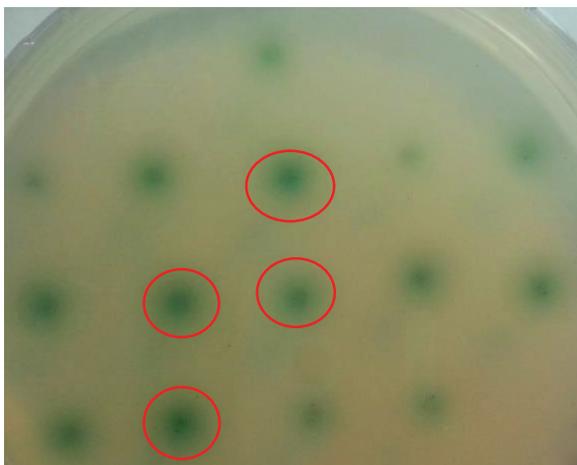


Рис. 3. Первичный отбор трансформантов *A. nidulans* – продуцентов рекомбинантной LacA на среде с АБТС.

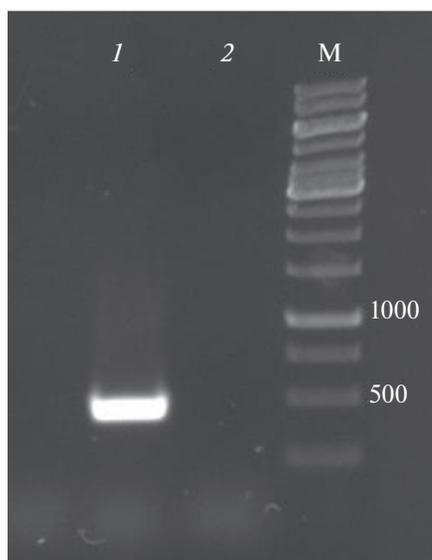


Рис. 4. Электрофорез ПЦР-фрагмента с геномной ДНК: 1 – *A. nidulans lac№ 4 (argB⁻)*, 2 – *A. nidulans 031 (argB2⁻, pyrG89⁻)*, М – маркеры, bp.

Полученную плазмиду трансформировали в штамм *A. nidulans 031 (argB2⁻, pyrG89⁻)*. Преимуществом штамма являлось то, что его геном секвенирован [21] и гены, кодирующие лакказы *sensu stricto*, не были обнаружены. Кроме того, для штамма была разработана эффективная методика трансформации и отбора целевых клонов, в которой в качестве маркерных генов использовали гены *argB* и *pyrG*, комплиментирующие мутации *argB2* и *pyrG89* соответственно. В настоящей работе трансформация проводилась совместно с плазмидой pJR15 [19], несущей комплиментирующий ген *pyrG* *A. nidulans* с отбором на селективной среде без добавления уридина и урацила.

Тестирование трансформантов на способность продуцировать лакказу. Первичное тестирование полученных трансформантов на способность продуцировать лакказу осуществлялось путем их посева на агаризованную питательную среду MM, содержащую АБТС в качестве хромогенного субстрата [18, 22, 23]. Колонии, вокруг которых появлялись окрашенные зоны наибольшего размера (30 шт.), были выбраны в качестве потенциальных продуцентов лакказы (рис. 3).

Отобранные трансформанты, перспективные для дальнейшего исследования, потенциально продуцирующие лакказу, культивировали в жидкой питательной среде MM. Было показано, что максимальная активность рекомбинантной лакказы А в КЖ по субстрату АБТС составляла 2.0 усл. ед./мл у трансформанта *A. nidulans lac№ 4 (argB⁻)* и была сопоставима с активностью рекомбинантной лакказы *Trametes versicolor*, ранее полученной в *A. niger* (2.7 усл. ед./мл [24]), и активностью рекомбинантной лакказы *T. villosa*, полученной в *A. oryzae* (3.0 усл. ед./мл [22]). Наличие плазмиды с геном *lacA* у штамма *A. nidulans lac№ 4 (argB⁻)* подтверждали с помощью ПЦР с геномной ДНК, выделенной из мицелия (рис. 4).

Культурально-морфологические особенности штамма *A. nidulans lac№ 4 (argB⁻)*. На агаризованной среде штамм образует круглые колонии диаметром 30–35 мм через 7 сут роста, поверхность колоний ровная, выпуклая, пушистая, текстура средней плотности. Край колоний плотный, ровный. Цвет колоний в зоне спороношения зеленовато-белый, обратная сторона палево-коричневая, экссудат отсутствует. Культура характеризуется умеренным спороношением, споры зеленого цвета.

Биотрансформация ПГ. Влияние изменений в генетическом аппарате штамма на его способность к трансформации стероидов оценивали, сравнивая с результатами трансформации ПГ исходным штаммом дикого типа *A. nidulans* ВКПМ F-1069 [10] и мутантным штаммом *A. nidulans 031 (argB⁻; pyrG⁻)*. Трансформацию ПГ штаммами проводили в течение 66 ч в одинаковых условиях, параллельно культивируя штаммы без ПГ в качестве контроля. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях.

Результаты биотрансформации ПГ штаммами *A. nidulans* приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, степень превращения (конверсия) ПГ новым штаммом за 66 ч трансформации была значительно выше, чем у *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans 031 (argB⁻; pyrG⁻)* – на 10.5 и 17.2% соответственно.

ТФЭ. В работах [10, 25] для извлечения продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды с мицелием, использовали метод ЖФЭ. В на-

Таблица 1. Конверсия ПГ штаммами *A. nidulans* на среде СМ и относительная селективность образования продуктов трансформации (мол. %) на 66 ч трансформации*

Стероиды	<i>A. nidulans</i> ВКПМ F-1069	<i>A. nidulans</i> 031 (<i>argB</i> ⁻ ; <i>pyrG</i> ⁻)	<i>A. nidulans</i> lac№4 (<i>argB</i> ⁻)
Конверсия ПГ (I), %	85.39	80.52	94.37
11 α -Гидрокси-ПГ(II)	17.05	13.8	26.51
11 α -Ацетокси-ПГ (III)	29.53	47.4	41.87
6 β ,11 α -Дигидрокси-ПГ (IV)	53.42	38.8	31.62

* Для расчета соотношения продуктов II, III, IV за 100% принимали количество молей конвертированного ПГ.

стоящей работе изучена возможность использования метода ТФЭ для выделения продуктов трансформации ПГ из культуральной среды без предварительного разрушения или отделения мицелия. В качестве сорбента был использован Macronet MN-200 – неионогенный макропористый полистирол, сшитый дивинилбензолом, один из перспективных полимеров для применения в биотехнологических процессах. Важным является также то, что сорбент легко регенерируется, полностью отдавая поглощенные вещества при обработке органическим растворителем [26, 27]. Предварительно было проведено изучение кинетики сорбции ПГ и мажорных продуктов его биотрансформации этим сорбентом из водной среды.

Кинетика сорбции стероидов из водной среды.

Для определения оптимального времени контакта сорбента с трансформационной средой изучали кинетику сорбции ПГ (I) и продуктов его трансформации (11 α -гидрокси-ПГ (II), 11 α -ацетокси-ПГ(III) и 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ (IV)) из модельных растворов (или суспензий). Следует отметить, что, если соединения II и IV, вносимые в воду в виде раствора в ДМСО, образовывали растворы, то при добавлении в воду растворов I и III в ДМСО наблюдалось образование мелкокристаллической суспензии, что, вероятно, было обусловлено ограниченной растворимостью этих

соединений в воде. Известно, что растворимость ПГ в дистиллированной воде при комнатной температуре составляет 16.8 мкг/мл [28].

После помещения фильтр-пакета с сорбентом в модельный раствор (суспензию) содержимое колбы перемешивали, что обеспечивало диффузию раствора стероида через капроновый фильтр внутрь пакета и обратно жидкости без стероида. Внутри пакета протекал процесс сорбции стероида из раствора. Вне пакета происходило постепенное растворение кристаллов стероида. Скорость перемешивания 60–70 об./мин была минимально необходимой для обеспечения диффузии и процесса сорбции без механического истирания гранул сорбента.

Капроновый фильтр-пакет защищал сорбент от налипания на гранулы полимера кристаллов стероидного соединения, не препятствуя при этом сорбции растворенного стероида из жидкой фазы. Определение количества остаточного стероида в колбе проводили по истечении условленного времени. На основании экспериментальных данных были построены кинетические кривые сорбции соединений I, II, III и IV (рис. 5).

Как видно из рис. 5, сорбция соединений II и IV из растворов протекала значительно быстрее, чем для соединений I и III из их суспензий. Полная сорбция соединения IV проходила за 48 ч, а

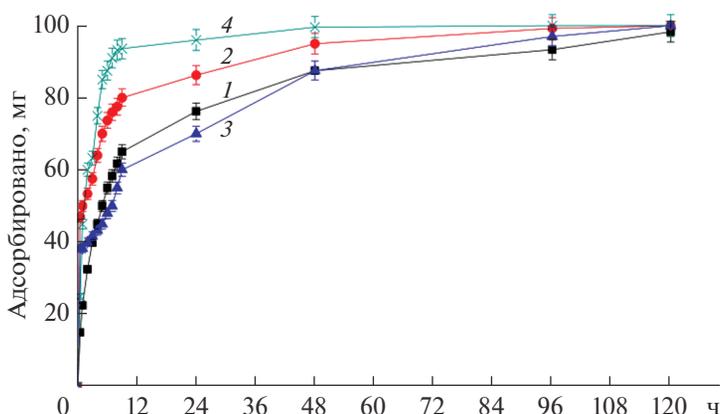


Рис. 5. Кинетические кривые адсорбции ПГ и мажорных продуктов на Macronet MN-200. 1 – ПГ, 2 – 11 α -гидрокси-ПГ, 3 – 11 α -ацетокси-ПГ, 4 – 6 β ,11 α -дигидрокси-ПГ.

соединения II за 96 ч. Сорбция соединения III завершалась через 120 ч. При этом через 120 ч сорбционного процесса содержание I в водной фазе составило 0.75 мг, то есть менее 1% от внесенного для трансформации. Особенностью процессов адсорбции в случае соединений I и III является более медленное достижение сорбционного равновесия, так как в этих случаях скорость процесса переноса вещества зависит от скорости перехода вещества из твердой фазы в раствор, диффузии растворенного вещества в растворе через капроновый фильтр и удаления его из раствора в результате адсорбции на полимере.

Полученные результаты позволили заключить, что оптимальная продолжительность контакта сорбента с КЖ составляла 120 ч.

Извлечение стероидов из трансформационной среды. Ранее [10] было показано, что в аналогичных условиях трансформации ПГ штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 образование максимального количества продукта IV достигалось через 96 ч и не изменялось в дальнейшем. Процесс энзиматического ацетилирования 11α -гидроксильной группы соединения II, напротив, продолжался и после того, как 6β -гидроксилирование прекращалось. При этом полная конверсия исходного субстрата I, а также интермедиата II, происходила за 216 ч трансформации. Для изучения возможности использования метода ТФЭ для извлечения продуктов биоконверсии ПГ штаммом *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) трансформацию проводили в течение 216 ч.

По окончании биотрансформации ПГ грибом *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) извлечение продуктов из трансформационной среды проводили в тех же качалочных колбах без отделения мицелия, помещая фильтр-пакет с сорбентом в колбу. Полноту сорбции оценивали хроматографически, отбирая пробы из трансформационной среды каждые 4–6 ч. Периодически пакет с сорбентом заменяли. Применение капронового фильтр-пакета защищало сорбент от загрязнения частицами ростовой среды и налипания на гранулы полимера мицелия, не препятствуя при этом сорбции растворенных стероидов из жидкой фазы. Для контроля полноты сорбции мицелий отделяли фильтрованием от жидкой фазы. Проводили ремацерацию мицелия метанолом, а фильтрат обрабатывали этилацетатом в условиях ЖФЭ. По данным ТСХ анализа в фильтрате и мицелии ПГ и продукты его трансформации отсутствовали.

По окончании сорбции проводили десорбцию стероидов с сорбента в фильтр-пакетах. Как правило, десорбцию стероидов с носителя проводят смешивающимися (алифатическими спиртами, ацетоном и др.) или не смешивающимися с водой растворителями (ароматическими углеводородами, эфирами уксусной кислоты, хлороформом, дихлорметаном и др.), а также их смесями [29, 30].

Десорбцию стероидов проводили в динамическом режиме ацетоном в аппарате Сокслета. Контроль полноты десорбции осуществляли методом ТСХ, анализируя содержимое экстрактов. Полная десорбция завершалась за 4 ч. При этом содержание продуктов в экстракте было следующим (мол. %): 11α -гидрокси-ПГ – 1.43; 11α -ацетокси-ПГ – 49.91; $6\beta,11\alpha$ -дигидрокси-ПГ – 22.49. На основании анализа полученных результатов был сделан вывод, что за 216 ч трансформации достигалась практически полная конверсия исходного субстрата ПГ, а относительная селективность образования мажорных продуктов трансформации составляла (мол. %): 11α -гидрокси-ПГ – 1.94; 11α -ацетокси-ПГ – 67.6; $6\beta,11\alpha$ -дигидрокси-ПГ – 30.46.

Ранее сообщалось о применении сорбционно-го способа для извлечения некоторых стероидов рядов прегнана и андростана из КЖ. Так, в патенте [31] описан способ использования сильноокислотного набухающего катионита для извлечения эпи-гидрокортизона и гидрокортизона из их КЖ после трансформации кортексолона (вещество “S” Рейхштейна) с концентрацией 0.5 и 0.6 г/л соответственно. При этом сорбцию проводили из культуральной среды после отделения мицелия. Синтетические неполярные макросетчатые полимерные сорбенты, синтезированные на основе дивинилбензола, нашли применение в ферментативном получении 3,17-дикетоандростанов, например, андрост-4-ен-3,17-диона, из стероидов [32] благодаря их способности селективно сорбировать 3,17-дикетоандростаны. Применение макросетчатого сорбента для извлечения продуктов трансформации ПГ из трансформационной среды без отделения мицелия описано нами впервые.

Полученные результаты показали, что наличие мутации у штамма *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) – продуцента гетерологичной лакказы А, не влияло на качественный состав мажорных продуктов трансформации ПГ, но приводило к изменению их количественного содержания. Следует отметить, что продукты II и III являются важными предшественниками в производстве высокоактивных стероидных соединений, в частности, адренокортикоидов [33]. Они также могут применяться как самостоятельные препараты с гестагенной и антиандрогенной активностью [34–36], причем 11α -гидрокси-ПГ (II) известен как регулятор кровяного давления [37] и обладает нейропротекторной активностью [38]. Соединение $6\beta,11\alpha$ -дигидрокси-ПГ (IV) может быть превращено в 11α -гидрокси-ПГ (II) известным способом [39].

Таким образом, штамм *A. nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) оказался более эффективным биокатализатором для трансформации ПГ в 11α -ацетокси-ПГ (III) и 11α -гидрокси-ПГ (II). Штамм можно рассматривать как перспективный объект для изучения его стероидтрансформирующей активности с ис-

пользованием других модельных стероидов, например, кортексолона (вещество “S” Рейхштейна) и андроста-4-ен-3,17-диона.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00653 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Пособие для врачей. М.: Новая волна, 2005. P. 579–580.
2. *Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // *Enz. Microb. Technol.* 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
3. *Donova M.V., Egorova O.V.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 94. № 6. P. 1423–1447.
4. *Lam K.S.* Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development, and Manufacturing. / Ed. J.A. Tao, G-Q Lin, A. Liese, N.Y.: Wiley, 2010. P. 213–227.
5. *Souness G.W., Latif S.A., Laurenzo J.L., Morris D.J.* // *Endocrinology.* 1995. V. 136. № 4. P. 1809–1812.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.4.7895695>
6. *Dutta T.K., Samanta T.B.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. № 6. P. 309–312.
<https://doi.org/10.1007/s002849900464>
7. *Henry M.J., Sisler H.D.* // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1984. V. 22. № 3. P. 262–275.
[https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90019-1)
8. *El-Refai A.H., Ghanem K.M.* // *Egyptian J. Microbiol. (EJM)* 1987. V. 22. № 2. P. 327–338.
9. *El-Refai A.H., Ghanem K.M.* // *Egyptian J. Microbiol. (EJM)* 1989. V. 23. № 1. P. 1–11.
10. *Savinova O.S., Solyev P.N., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Fedorova T.V., Savinova T.S.* // *Steroids.* 2019. V. 149. Article 108421.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.05.013>
11. *Dermastia M., Rozman D., Komel R.* // *FEMS Microbiology Letters* 1991. V. 77. № 2–3. P. 145–150.
12. *Rozman D., Komel R.* // *Curr Genet.* 1992. V. 22. № 2. P. 123–127.
<https://doi.org/10.1007/BF00351471>
13. *Khomutov S.M., Shutov A.A., Chernikh A.M., Myasoe-dova N.M., Golovleva L.A., Donova M.V.* // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2016. V. 123. P. 47–52.
14. *Baldrian P.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. V. 30. № 2. P. 215–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
15. *Christensen U., Gruben B.S., Madrid S., Mulder H., Nikolaev I., de Vries R.P.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 19. P. 7084–7087.
16. *Čapek A., Tadra M., Tůma J.* // *Folia Microbiologica.* 1964. V. 9. № 6. P. 380–382
17. *Абянова А.Р., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Федорова Т.В., Логинов Д.С., Королева О.В., Беневоленский С.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 342–347.
18. *Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J.* // *Curr. Genet.* 1995. V. 28. № 5. P. 474–477.
<https://doi.org/10.1007/BF00310818>
19. *Oakley B.R., Rinehart J.E., Mitchell B.L., Oakley C.E., Carmona C., Gray G.L., May G.S.* // *Gene.* 1987. V. 61. № 3. P. 385–399.
20. *Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V.* // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 183–190.
21. *Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L.J., Wortman J.R., Batzoglou S. et al.* // *Nature.* 2005. V. 438. № 7071. P. 1105–1115.
22. *Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalborge H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 3. P. 834–841.
23. *Berka R.M., Schneider P., Golightly E.J., Brown S.H., Madden M., Brown K.M., Halkier T., Mondorf K., Xu F.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. № 8. P. 3151–3157.
24. *Bohlin C., Jönsson L.J., Roth R., van Zyl W.H.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129. P. 195–214.
25. *Савинова О.С., Васина Д.В., Сольев П.Н., Федорова Т.В., Тяжелова Т.В., Савинова Т.С.* // Актуальная биотехнология. 2018. Т. 3. № 26. С. 258.
26. <https://www.purolite.com/product-pdf/MN200.pdf>
27. *Tsyurupa M.P., Davankov V.A.* // *React. Funct. Polym.* 2002. V. 53. № 2–3. P. 193–203.
[https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00173-6](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00173-6)
28. *Haskins A.L.* // *Proc. Society for Experimental Biology and Medicine.* 1949. V. 70. № 2. P. 228–229.
29. *Парбузина И.Л., Маслина Т.И., Калинкина З.В., Романчук М.А.* // Хим.-фарм. журн. 1973. Т. 7. № 12. С. 34–38.
30. Патент РФ. № 2049792. 1995.
31. Патент США. № 3356695. 1967.
32. Патент РФ. 2003. № 2205224.
33. *Zohri A.A.* // *Folia Microbiol. (Praha).* 2000. V. 45. № 5. P. 391–396.
34. Патент Германии. 1979. № 2757024.
35. Патент РФ. 2011. № 2432952.
36. *Savechenkov P.Y., Chiara D.C., Desai R., Stern A.T., Zhou X., Ziembra A.M., Szabo A.L., Zhang Y., Cohen J.B., Forman S.A., Miller K.W., Bruzik K.S.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 136. P. 334–347.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.043>
37. *Habibi Z., Yousefi M., Ghanian S., Mohammadi M., Ghasemi S.* // *Steroids.* 2012. V. 77. P. № 13. 1446–1449.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.043>
38. *Yamaguchi T., Lee J.-H., Lim A.-R., Yu E.-J., Oh T.-J.* // *Steroids.* 2019. V. 145. P. 32–38.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.008>
39. Патент США 1957. № 2787624.

Obtainment of *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) and its Application for Progesterone Transformation

O. S. Savinova^{a,*}, A. M. Chulkin^a, T. S. Savinova^b, E. A. Vavilova^a,
D. V. Vasina^a, P. N. Solyev^c, and T. V. Fedorova^a

^a*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Moscow, 119071 Russia*

^b*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991 Russia*

^c*Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow 119991 Russia*

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

The strain of *Aspergillus nidulans* lac№ 4 (*argB*⁻) – a producer of the recombinant laccase A of basidiomycete *Trametes hirsuta* 072 – was obtained. A biocatalytic transformation of progesterone (PG) was carried out with a new strain. 11 α -Hydroxy-PG, 11 α -acetoxy-PG and 6 β ,11 α -dihydroxy-PG were the major biotransformation products. The kinetics of sorption of PG and the main products of its biotransformation from the transformation medium using the Macronet MN-200 sorbent were studied. The effectiveness of steroids solid-phase extraction method without preliminary separation of the mycelium has been proposed.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, laccase, *Trametes hirsuta*, solid phase extraction, Macronet MN-200, progesterone, 11 α -hydroxyprogesterone, 11 α -acetoxyprogesterone, 6 β ,11 α -dihydroxyprogesterone