

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Лучникова Наталья Алексеевна

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ  
ОЛЕАНАНОВОГО РЯДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АКТИНОМИЦЕТОВ  
РОДА *RHODOCOCCUS***

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители

доктор биологических наук, профессор,  
академик РАН **Ившина Ирина Борисовна**

кандидат химических наук, доцент  
**Гришко Виктория Викторовна**

Пермь – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Обзор литературы.....	11
Глава 1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ ОЛЕАНАНОВОГО И УРСАНОВОГО РЯДА.....	11
1.1. Распространение в природе.....	12
1.2. Биосинтез пентациклических тритерпеновых кислот с использованием генномодифицированных микроорганизмов.....	17
1.3. Биологическая активность тритерпеновых кислот и их нативных производных.....	32
1.4. Биологическая трансформация.....	37
1.4.1. Грибная трансформация.....	39
1.4.2. Бактериальная трансформация.....	46
1.5. Актиномицеты – перспективные биотрансформаторы сложных гидрофобных соединений.....	57
Экспериментальная часть.....	61
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	61
2.1. Рабочая коллекция.....	61
2.2. Химические реагенты.....	61
2.3. Растворимость олеаноловой и глицирретовой кислот.....	75
2.4. Условия культивирования.....	75
2.5. Контроли.....	75
2.6. Иммунизация бактериальных клеток.....	76
2.7. Суспензии нерастущих клеток.....	76
2.8. Отдельные клеточные фракции.....	77
2.9. Жизнеспособность бактериальных клеток.....	77
2.10. Электрокинетический потенциал.....	78
2.11. Внутриклеточные липидные включения.....	78
2.12. Микроскопические исследования.....	79
2.13. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов.....	81
2.14. Респираторная активность.....	81

2.15. Полногеномное секвенирование .....	81
2.16. Биоинформатический анализ.....	82
2.17. Молекулярно-генетический анализ .....	82
2.18. Количественный и качественный анализ олеаноловой и глицирретовой кислот и продуктов их биотрансформации.....	83
2.19. Препаративное выделение и идентификация продуктов биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот .....	85
2.20. <i>In silico</i> анализ продуктов биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот .....	88
2.21. Фитотоксичность олеаноловой и глицирретовой кислот и продуктов их биотрансформации .....	89
2.22. Антибактериальная активность.....	89
2.23. Цитотоксическая активность.....	90
2.24. Статистическая обработка результатов.....	91
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ ОЛЕАНОЛОВУЮ И ГЛИЦИРРЕТОВУЮ КИСЛОТЫ .....	92
Глава 4. ВЛИЯНИЕ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ.....	99
Глава 5. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ .....	111
5.1. Использование иммобилизованных клеток .....	111
5.2. Использование суспензий нерастаущих клеток .....	112
Глава 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ .....	121
Глава 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ .....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	148
ВЫВОДЫ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** На фоне дефицита высокоэффективных фармакологических средств для лечения социально значимых заболеваний актуальной задачей является синтез новых химических соединений с биологической активностью на основе растительных пентациклических тритерпеноидов, в том числе олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот (Calixto, 2019; Kumar, Dubey, 2019). Данные тритерпеновые кислоты используются для получения производных с выраженной противовирусной, противомикробной, противовоспалительной, противоопухолевой и гепатопротекторной активностью (Huang *et al.*, 2014; Wiemann *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2017). В настоящее время преобразование тритерпеноидов в основном осуществляется с использованием химических методов, которые реализуются в условиях экстремальных показателей кислотности, температуры и требуют применения дорогостоящих катализаторов, а также защитных групп реакционно-активных центров молекулы (Alho *et al.*, 2019).

Наряду с химической модификацией, предпринимаются попытки биологической трансформации ОК и ГК с использованием микроорганизмов. Это обусловлено исключительной хемо- и стереоселективностью катализируемых реакций, отсутствием проблемы минимизации побочных реакций или необходимости в стадиях защиты и снятия защитных групп реакционно-активных центров молекулы, а также, что немаловажно, устойчивой активностью в экстремальных условиях среды. Подавляющая часть описанных на сегодня процессов биотрансформации ОК и ГК осуществляется с использованием грибов и сопровождается образованием гидрокси-, оксо- и гликозидных производных (Capel *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018). Однако эти процессы характеризуются сравнительно низким (от 2,6 до 43,2%) уровнем биоконверсии субстрата, технологически нецелесообразны вследствие мицелиального характера роста грибов и потенциально могут представлять опасность из-за способности их к выработке микотоксинов с выраженным мутагенным и канцерогенным действием.

Примеры бактериальной трансформации ОК и ГК единичны и включают процессы, катализируемые представителями родов *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, среди которых немало штаммов с выраженными патогенными свойствами. При этом описанные бактерии проявляют каталитическую активность в отношении сравнительно невысоких (до 0,3 г/л) концентраций тритерпеноидов (Ludwig *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017b; Xu *et al.*, 2020).

В связи с этим актуален поиск новых бактериальных катализаторов направленной трансформации ОК и ГК. Одной из активно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются непатогенные актиномицеты экологически значимых видов, характеризующиеся наибольшим разнообразием трансформируемых сложных гидрофобных субстратов (Ivshina *et al.*, 2017). Типично бактериальный характер роста, лабильность метаболической системы и высокая катаболическая активность в экстремальных условиях внешней среды обуславливают перспективность использования актиномицетов для биотрансформации ОК и ГК. Способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к направленной биоконверсии пентациклических тритерпеноидов ранее была показана на примере бетулина с образованием биологически активного бетуллона (Grishko *et al.*, 2013).

**Цель настоящей работы** – оценка способности коллекционных штаммов актиномицетов к окислительной трансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда на примере олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот для получения новых фармакологически активных соединений.

**Основные задачи исследования:**

1. Исследовать каталитическую активность коллекционных штаммов актиномицетов в отношении ОК и ГК. Отобрать эффективные биотрансформаторы ОК и ГК.
2. Выявить механизмы взаимодействия бактериальных клеток с тритерпеновыми субстратами.

3. Определить оптимальные условия процесса окислительной биотрансформации ОК и ГК с целью максимального выхода целевых продуктов.

4. Идентифицировать основные метаболиты ОК и ГК и оценить их биологическую активность.

5. Определить локализацию ферментных систем, участвующих в процессе окислительной биотрансформации тритерпеноидов. Исследовать функциональную характеристику генов, кодирующих ферменты метаболизма ОК и ГК.

**Научная новизна.** На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmcsl.ru>) впервые установлена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда – ОК и ГК. Выявлены наиболее типичные адаптивные реакции родококков на присутствие тритерпеновых кислот – от изменения морфометрических показателей и рельефа бактериальных клеток до образования в результате адгезии многоклеточных агрегатов, а также синтеза и аккумуляции резервных энергетических веществ. Использование суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* обеспечивает полную биоконверсию ОК и ГК в высоких (1,0 г/л) концентрациях. Полученные метаболиты ОК и ГК идентифицированы как 3-оксопроизводные. При использовании клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 документированы новые реакции С5 гидроксирования и С23 карбоксилирования молекулы ОК с образованием ранее неопisanного полиоксигенированного метаболита – 3β,5α,22α-тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5α,22α-дигидроксигипсогеновой) кислоты. По данным *in silico* анализа, полученные метаболиты обладают пониженной токсичностью по сравнению с исходными кислотами и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов. В условиях *in vitro*

обнаружена антибактериальная активность полученных метаболитов – 3-оксо-ОК и 5 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -дигидроксигипсогеновой кислоты. С использованием биоинформатического анализа результатов NGS-секвенирования штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* и последующей постановки ПЦР в реальном времени выявлены гены, ответственные за образование ферментов семейства CYP450, участвующих в процессе биоконверсии тритерпеноидов.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные сведения расширяют представление о биокаталитическом потенциале родококков и возможности их использования в качестве перспективных биопродукторов новых фармакологически активных соединений на основе растительных пентациклических тритерпеноидов. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, ИЭГМ 1360, характеризующиеся высокой каталитической активностью в отношении ОК и ГК. Получены метаболиты, идентифицированные как 3-оксопроизводные ОК и ГК. Обнаружен ранее неизвестный метаболит – 5 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -дигидроксигипсогеновая кислота. Рентгеноструктурные данные ранее неопищенного производного размещены в Кембриджском центре кристаллографических данных (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>) под номером CCDC 2211937. Экспериментально подтверждено участие мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе окислительной биотрансформации ОК и ГК. Составлен Каталог функциональных генов биоконверсии ОК и ГК. Сведения о полных геномах *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (JAJNCO000000000.1), ИЭГМ 1360 (JAJNCN000000000.1) внесены в международную базу данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 по форме “патентное депонирование” переданы во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номерами Ас-2191 и Ас-2189 соответственно. Подана заявка № 2023111046 на получение патента РФ “Способ получения 5 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*”. Результаты исследования

используются в учебных курсах “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” и “Введение в биотехнологию” для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штаммах-биотрансформаторах тритерпеновых кислот внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegmc.ru/strains>).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Актиномицеты рода *Rhodococcus* используют ОК и ГК в качестве единственного источника углерода и энергии. Наибольшую трансформирующую активность проявляют штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, катализирующие биоконверсию тритерпеноидов в концентрации 1,0 г/л в течение 5 сут.

2. Наиболее типичные реакции родококков на присутствие тритерпеновых кислот (ОК, ГК) – изменение морфометрических показателей бактериальных клеток, степени их шероховатости, усиление гидрофобных взаимодействий между клетками, адгезия, переход от одноклеточного к агрегированному состоянию, сверхсинтез и аккумуляция резервных энергетических веществ (липиды, полифосфаты).

3. Максимальный выход целевых продуктов окисления ОК и ГК обеспечивает использование суспензий (ОП<sub>600</sub> 2,0–2,6) нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 при значениях pH 8,0 и 6,0 соответственно.

4. Основные метаболиты ОК и ГК – 3-оксопроизводные. Биотрансформация ОК сопровождается образованием дополнительной ранее неописанной 3β,5α,22α-тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5α,22α-дигидроксигипсогеновой) кислоты. Выявленные метаболиты характеризуются антибактериальной активностью, по данным *in silico* – менее токсичны по сравнению с ОК и ГК и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов.

5. В процессе биотрансформации ОК и ГК участвуют мембранно-связанные ферменты, в том числе принадлежащие к семейству CYP450. Составленный Каталог генов, кодирующих ферменты окислительной трансформации ОК и ГК, пригоден для поиска целевых генов.

**Апробация работы и публикации.** Основные положения научно-квалификационной работы доложены и обсуждены на World Summit on Catalysis Engineering and Technology (CatET-2019), Valencia, Spain, 2019; XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия», Пермь, 2019; VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Ялта, 2020; Всероссийской междисциплинарной молодежной научной конференции с международным участием «IX Информационная школа молодого ученого», Екатеринбург, 2021; Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования», Пермь, 2021; Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов», Владивосток, 2022.

По теме научно-квалификационной работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе в научных журналах Микробиология, Catalysts, Molecules, Pharmaceuticals.

**Объем и структура научно-квалификационной работы.** Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 58 рисунков. Научная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 210 наименований работ, в том числе 9 отечественных и 201 зарубежных.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.** Работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального

исследовательского университета и «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (Соглашение № 075.15-2021-1051) и Госзаданий Минобрнауки РФ (АААА-А19-119112290008-4, АААА-А20-120081990069-3, 122010800029-1), поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (Аспиранты, № 20-34-90104). Научные положения и выводы работы базируются на результатах собственных исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Исследования с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, а также энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с картированием элементов проводили на базе центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.). Идентификацию продуктов трансформации методами ГХ-МС и ЯМР, а также оценку цитотоксической активности осуществляли на базе лаборатории биологически активных веществ «Института технической химии УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН (зав. лаб. – к.х.н. Гришко В.В.); идентификацию нового метаболита с использованием метода РСА – на базе кафедры органической химии Пермского государственного национального исследовательского университета (зав. каф. – д.х.н. Масливец А.Н.).

## Глава 1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ ОЛЕАНАНОВОГО И УРСАНОВОГО РЯДА

Доля лекарственных препаратов, полученных на основе вторичных метаболитов растений, составляет около 25% мирового фармацевтического рынка (Calixto, 2019). Растительные вторичные метаболиты представлены несколькими группами соединений, среди них наиболее многочисленна (~25000 представителей) и разнообразна группа терпеновых углеводородов и их кислородсодержащих производных (терпеноидов), которые в зависимости от количества звеньев изопрена ( $C_5H_8$ ) в структуре соединения, содержат определенное количество атомов углерода и подразделяются на моно- ( $C_{10}$ ), сескви- ( $C_{15}$ ), ди- ( $C_{20}$ ), тритерпеноиды ( $C_{30}$ ) и т.д.

Тритерпеноиды в природе представлены более чем 100 разнообразными типами скелета (Kumar, Dubey, 2019). Интерес исследователей к нативным тритерпеноидам, в частности представителям ряда олеанана и урсана, часто обусловлен их доступностью, а также широким спектром проявляемой биологической активности, включая противомикробную, противовоспалительную, противоопухолевую, цитотоксическую, гепатопротекторную, антидиабетическую и др. (Duric *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). Молекулы тритерпеноидов характеризуются повышенной гидрофобностью, что значительно ограничивает их применение в качестве эффективных фармакологических агентов. В настоящее время одним из наиболее распространенных способов повышения эффективности и биодоступности тритерпеноидов является химическая модификация, обычно протекающая при повышенных значениях температуры и pH, часто с использованием дорогостоящих реагентов и необходимостью введения защитных групп реакционно-активных центров молекулы (Grishko *et al.*, 2014; Chouaïb *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017; Alho *et al.*, 2019). Альтернативный подход к получению ценных производных – использование метода биотрансформации на основе

ферментативной активности микроорганизмов, который реализуется при нормальных и экологически безопасных условиях среды, с высоким уровнем регио- и стереоселективности, в одну технологическую стадию. Кроме того, микробная конверсия позволяет осуществлять специфическую модификацию сайтов молекулы тритерпеноида, которые не доступны или модификация которых протекает с низкой эффективностью в условиях синтетических превращений (Shah *et al.*, 2014). На настоящий момент среди известных биокатализаторов процесса трансформации тритерпеноидов более всего изучены мицелиальные грибы (Fu *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2018), тогда как бактериальные катализаторы представлены лишь единичными видами грамположительных бактерий (Grishko *et al.*, 2013; Ludwig *et al.*, 2015; Tarasova *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

### 1.1. Распространение в природе

В природе самыми распространенными и многочисленными являются пентациклические тритерпеноиды растительного происхождения типа олеанана и урсана (Рисунок 1).

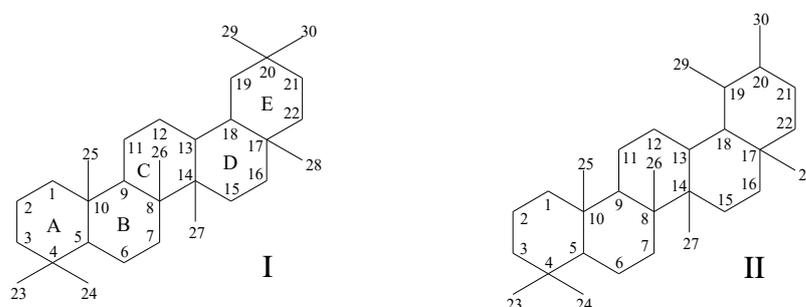


Рисунок 1 – Структуры углеродного остова пентациклических тритерпеноидов типа олеанана (I) и урсана (II)

В свободном состоянии тритерпеноиды представляют собой нелетучие липофильные вещества, растворимые в органических растворителях и нерастворимые в воде. В качестве наиболее доступных олеанановых тритерпеноидов следует отметить олеаноловую **1** (ОК, 3 $\beta$ -гидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, CAS 508-02-1) и глицирретовую **2** (ГК, 3 $\beta$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота, C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>, CAS 471-53-4)

кислоты, среди урсановых – урсоловую кислоту **3** (УК, 3 $\beta$ -гидроксиурс-12-ен-28-овая кислота, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, CAS 77-52-1). Биосинтез пентациклических тритерпеноидов ряда олеанана и урсана в растениях происходит путем конверсии ациклического терпена сквалена (**4**) в 2,3-оксидсквален (**5**) и дальнейшей его циклизации при участии специфических ферментных комплексов (оксидсквален-циклазы) через  $\beta$ -амирин (**6**) или  $\alpha$ -амирин (**7**) соответственно (Hill, Connolly, 2012; Thimmapra *et al.*, 2014) (Рисунок 2). Таким образом, углеродный скелет данных тритерпеноидов представляет собой систему пяти конденсированных циклогексановых колец и отличается только положением одной метильной группы (CH<sub>3</sub>-29), которая находится при атомах C20 или C19 кольца E олеанановых или урсановых производных соответственно.

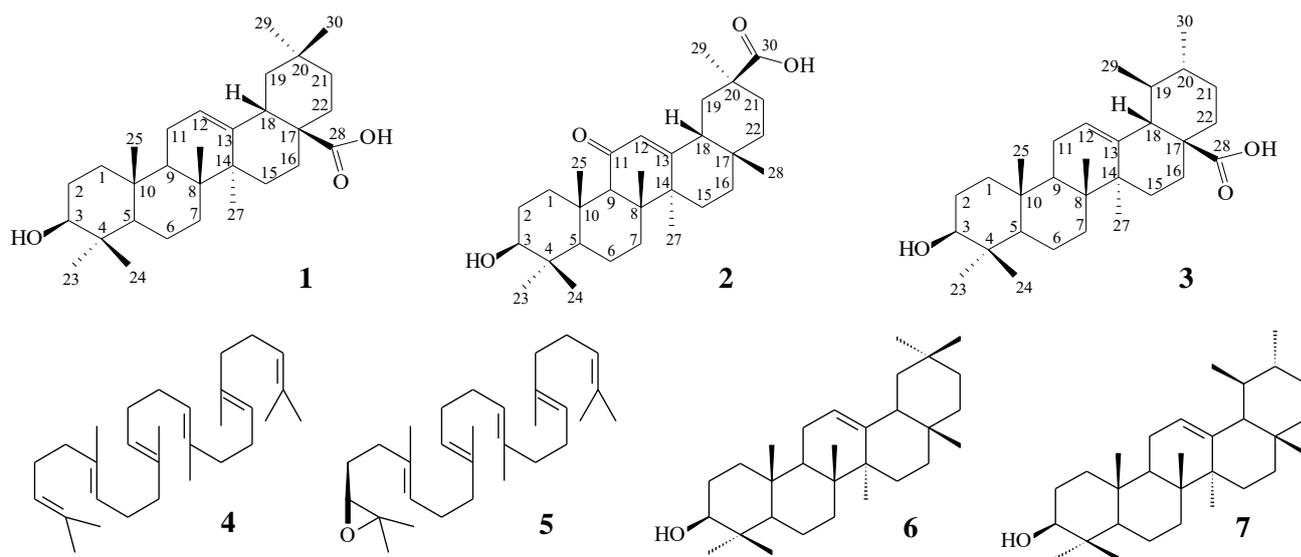


Рисунок 2 – Структурные формулы соединений **1–7**

Представители разнообразных семейств высших растений являются активными продуцентами как олеанановых, так и урсановых тритерпеноидов (Таблица 1). Зачастую ОК и УК детектируются одновременно в одних и тех же растительных источниках. Так, содержание ОК и УК в традиционно используемых в китайской медицине растениях *Meconopsis henrici* (меконописис Генри), *Dracocephalum tanguticum* (змееголовник тангутский), *Comastoma pulmonaria* (комастома легочная), *Corydalis impatiens* (хохлатка недотрога),

*Swertia racemosa* (сверция кистевидная) может достигать  $0,96 \pm 0,01$  мг/г и  $0,64 \pm 0,01$  мг/г сухого веса соответственно (Wu *et al.*, 2015). Цветы и листья кустарников и трав *Ocimum tenuiflorum* (базилик тонкоцветный), *Syzygium aromaticum* (гвоздичное дерево), *Origanum vulgare* (душица обыкновенная), *Rosmarinus officinalis* (розмарин лекарственный), *Salvia officinalis* (шалфей лекарственный), применяемых в качестве приправ, содержат до 15,3 мг/г ОК и до 26,2 мг/г УК (влажного веса) (Moldoveanu, Scott, 2016). При этом основным источником ОК считаются плоды и листья *Olea europaea* (олива европейская). Содержание кислоты в листьях оливы может достигать 27,16 мг/г влажного веса и до  $25,09 \pm 0,72$  мг/г сухого веса (Peragon, 2013; Moldoveanu, Scott, 2016). ГК традиционно извлекается из травянистых растений рода *Glycyrrhiza* (солодка) (Li *et al.*, 2010; Kalani *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014), содержание данной кислоты в корнях которых может достигать  $10,2 \pm 1,7$  мг/г влажного веса (Ko *et al.*, 2007).

Содержание пентациклических тритерпеноидов в растительных объектах непостоянно и довольно сильно варьирует в зависимости от активности ферментных систем и множества внешних факторов (Woźniak *et al.*, 2015). Так, содержание ОК в плодах и листьях оливы различных сортов колеблется от  $0,4 \pm 0,1$  мг/г до  $0,81 \pm 0,16$  мг/г сухого веса и от  $29,2 \pm 1,8$  мг/г до  $34,5 \pm 3,1$  мг/г сухого веса соответственно (Guinda *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2010). По мере созревания плодов оливы наблюдается снижение содержания в них ОК на 70–80% (Peragon, 2013). Та же тенденция наблюдается при созревании плодов *Vitis vinifera* (виноград культурный) (Pensec *et al.*, 2014). Кроме того, изменение концентрации пентациклических тритерпеноидов в растительных источниках может быть связано со спецификой климата, сезона, ландшафта и стратегией культивирования (Romero *et al.*, 2010).

Таблица 1 – Растительные источники ОК, ГК и УК

Соединение	Растительный источник (семейство, вид)	Часть растения	Литературный источник
<i>Aprocynaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК, УК	<i>Alstonia scholaris</i> (L.) R. Br.	Листья	Wang <i>et al.</i> , 2014
ОК, УК	<i>Plumeria obtusa</i> L. var. <i>sericifolia</i>	Листья	Alvarado <i>et al.</i> , 2015
<i>Aquifoliaceae</i> DC. ex A. Rich.			
ОК, УК	<i>Ilex guayusa</i> L.	Листья	Moldoveanu, Scott, 2016
<i>Araliaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК	<i>Panax stipuleanatus</i> H.T. Tsai & K. M. Feng	Корни	Huong <i>et al.</i> , 2016
<i>Asteraceae</i> Bercht. & J. Presl, nom. cons.			
ОК	<i>Baccharis uncinella</i> DC	Листья	Yamamoto <i>et al.</i> , 2014
<i>Betulaceae</i> Gray			
ОК	<i>Betula pendula</i> Roth	Кора	Duric <i>et al.</i> , 2013; Falev <i>et al.</i> , 2020
<i>Cornaceae</i> Bercht. & J. Presl, nom. cons.			
УК	<i>Cornus officinalis</i> Torr. ex Dur.	Семена	Jang <i>et al.</i> , 2014
<i>Ebenaceae</i> Gürke, nom. cons.			
ОК, УК	<i>Diospyros</i> L.	Плоды	Zhang <i>et al.</i> , 2014
<i>Ericaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК, УК	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	Плоды	Moldoveanu, Scott, 2016
ОК, УК	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	Плоды	Falev <i>et al.</i> , 2020
<i>Fabaceae</i> Lindl.			
ГК	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Корни	Kalani <i>et al.</i> , 2013
	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	Корни	Chen <i>et al.</i> , 2014
	<i>Glycyrrhiza inflata</i> Batalin	Корни	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>Gentianaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК, УК	<i>Comastoma pulmonaria</i> Turcz.	Побеги, корни	Wu <i>et al.</i> , 2015

## Продолжение таблицы 1

Соединение	Растительный источник (семейство, вид)	Часть растения	Литературный источник
	<i>Swertia racemosa</i> Wall. ex Griseb.	Побеги, корни	
<i>Lamiaceae</i> Martinov			
ОК, УК	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Листья	Moldoveanu, Scott, 2016
	<i>Lavula angustifolia</i> Mill.	Цветы	
	<i>Origanum vulgare</i> L.	Листья	
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Листья	
	<i>Salvia officinalis</i> L.	Листья	
	<i>Dracocephalum tanguticum</i> Maxim	Побеги, корни	Wu <i>et al.</i> , 2015
<i>Lythraceae</i> J.St.-Hil.			
ОК, УК	<i>Punica granatum</i> L.	Плоды	Wu <i>et al.</i> , 2015
	<i>Punica granatum</i> L. cv. Daqingpi	Цветы	Fu <i>et al.</i> , 2014
<i>Malvaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК	<i>Durio zibethinus</i> Murr.	Плоды	Feng <i>et al.</i> , 2018
<i>Myrtaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК, УК	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry	Цветы	Moldoveanu, Scott, 2016
	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Листья	
<i>Oleaceae</i> Hoffmanns. & Link, nom. cons.			
ОК	<i>Olea europaea</i> L. cv. Picual	Плоды, листья	Peragon, 2013
	<i>Olea europaea</i> L. cv. Cornezuelo		
ОК, УК	<i>Olea europaea</i> L.	Листья	Moldoveanu, Scott, 2016
<i>Papaveraceae</i> Juss.			
ОК, УК	<i>Meconopsis henrici</i> Bureau & Franch.	Побеги, корни	Wu <i>et al.</i> , 2015
	<i>Corydalis impatiens</i> (Pall.) Fisch. ex DC.	Побеги, корни	

## Окончание таблицы 1

Соединение	Растительный источник (семейство, вид)	Часть растения	Литературный источник
<i>Pinaceae</i> Lindl.			
УК	<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.	Смола, хвоя, побеги	Oancea <i>et al.</i> , 2019
<i>Rosaceae</i> Juss.			
ОК, УК	<i>Malus</i> P. Mill.	Плоды	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Pyrus</i> L.	Плоды	
УК	<i>Fragaria ananassa</i> (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier	Околоцветник	Song <i>et al.</i> , 2013
УК	<i>Potentilla fulgens</i> Wall. ex Hook.	Корни	Choudhary <i>et al.</i> , 2013
ОК, УК	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl	Листья	Li <i>et al.</i> , 2017
<i>Rubiaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК	<i>Uncaria laevigata</i> Wall. ex G. Don	Кора ствола	Wang <i>et al.</i> , 2013
УК	<i>Emmenopterys henryi</i> Oliv.	Листья, побеги	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Vitaceae</i> Juss., nom. cons.			
ОК	<i>Vitis vinifera</i> L.	Плоды	Zhang <i>et al.</i> , 2014

### 1.2. Биосинтез пентациклических тритерпеновых кислот с использованием генномодифицированных микроорганизмов

В настоящее время получение основного объема пентациклических тритерпеновых кислот и их природных производных осуществляется путем экстракции из растительных источников. Однако процессы экстракции и разделения искомым соединений (чаще всего с использованием органических растворителей) являются крайне трудоемкими, энерго- и времязатратными. Кроме того, концентрация большей части пентациклических тритерпеноидов в растениях относительно мала, что обуславливает использование внушительного количества растительного сырья и приводит к образованию большого объема отработанной биомассы и используемых в экстракции растворителей (Zhu *et al.*, 2018).

Альтернативным источником пентациклических тритерпеноидов могут стать все более популярные в последнее десятилетие высокоэффективные “клеточные фабрики”, использование которых позволяет получать ценные биологически активные вещества растительного происхождения в экологически чистых условиях с использованием в качестве единственного источника углерода доступных соединений (глюкоза, галактоза, этанол) (Krivoruchko, Nielsen, 2015). Клеточные фабрики основаны, как правило, на клетках дрожжей, естественно катализирующих мевалонатный (MVA) путь, с внедрением в их геном растительных генов, ответственных за синтез пентациклических тритерпеноидов. MVA путь включает образование с участием белка HMG1 мевалоната, трансформирующегося в дальнейшем в изопентенил дифосфат и диметилаллил дифосфат, которые под действием фарнезил-фосфат-синтазы превращаются в фарнезил дифосфат. Наличие данного пути обеспечивает естественный синтез сквалена (4) – общего прекурсора тритерпеноидов – на основе двух молекул фарнезил дифосфата с помощью сквален-синтазы и последующую его трансформацию в 2,3-оксидосквален (5) с помощью сквален-эпоксидазы (Lu *et al.*, 2018). Дальнейший синтез пентациклических тритерпеноидов проходит при участии внедренных растительных генов, кодирующих амирин-синтазы, CYP450 и CYP450-редуктазы (Таблица 2).

Гены, кодирующие фермент  $\beta$ -амирин-синтазу ( $\beta$ AS), действие которого сопровождается образованием  $\beta$ -амирина (6) – прекурсора олеанановых пентациклических тритерпеноидов – из 2,3-оксидосквалена (5), выделяются из геномов *Glycyrrhiza glabra* (солодка голая), *Panax ginseng* (женьшень обыкновенный), *Catharanthus roseus* (катарантус розовый), *Lotus japonicas* (лотос японский), *Artemisia annua* (полынь однолетняя), *Chenopodium quinoa* (киноа) и др. (Fukushima *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018; Dale *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). На настоящий момент не обнаружено ферментов, обеспечивающих непосредственный синтез  $\alpha$ -амирина (7) – прекурсора урсановых пентациклических тритерпеноидов, поэтому в данных реакциях

участвуют смешанные амирин-синтазы (mix-AS) из *Eriobotrya japonica* (эриоботрия японская) и *C. roseus* (катарантус розовый), катализирующие образование как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -амирина (Lu *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2019). Наиболее часто для поиска генов, ответственных за синтез ферментов CYP450, катализирующих последующее превращение  $\alpha$ - и  $\beta$ -амирина, используется *Medicago truncatula* (люцерна усеченная) (Fukushima *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014; Moses *et al.*, 2014a; Lu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Реже для этой цели используются *Phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная) (Moses *et al.*, 2014b), *Vupleurum falcatum* (володушка серповидная) (Moses *et al.*, 2014a), *G. uralensis* (солодка уральская) (Zhu *et al.*, 2018), *C. roseus* (катарантус розовый) (Lu *et al.*, 2018) *Crataegus pinnatifida* (боярышник перистонадрезанный) (Dai *et al.*, 2019), *Solanum lycopersicum* (томат), *P. ginseng* (женьшень обыкновенный) (Dale *et al.*, 2020) и др. Нативные цитохром P450-редуктазы микроорганизмов зачастую не способны обеспечить каталитическую активность чужеродных CYP450, поэтому источником дополнительных CYP450-редуктаз (CPR, ATR), как правило, является *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля) (Dai *et al.*, 2014; Moses *et al.*, 2014b; Lu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). В единичных работах CYP450-редуктазы получены из *M. truncatula* (люцерна усеченная) (Zhao *et al.*, 2018), *L. japonicas* (лотос японский) (Fukushima *et al.*, 2013), *G. uralensis* (солодка уральская) (Zhu *et al.*, 2018) и *V. vinifera* (виноград культурный) (Dai *et al.*, 2019).

С целью достижения высокого выхода пентациклических тритерпеноидов используются различные подходы к интенсификации микробного биосинтеза: модификация, сверхэкспрессия или инактивирование собственных генов микроорганизмов, применение различных техник включения растительных генов в геном дрожжей, а также комбинаторный биосинтез. Интенсификации биосинтеза тритерпеноидов может способствовать сверхэкспрессия генов *ERG1* (сквален-эпоксидаза), *ERG9* (сквален-синтаза), *ERG20* (фарнезил-фосфат-синтаза) и, чаще всего, *tHMG1* (3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктаза с отсеченными 511 аминокислотами на N-конце), участвующих в естественном

микробном синтезе 2,3-оксидосквалена (Dai *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Наряду со сверхэкспрессией, процессу интенсификации может способствовать и инактивирование таких генов, как *TRP1* (фосфорибосилантранилат-изомераза), *GAL1* (галактокиназа) и *GAL80* (регуляторный белок метаболизма галактозы/лактозы), участвующих в метаболических процессах клетки и “отвлекающих” клетку от биосинтеза тритерпеноидов (Dai *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018). Таким образом, сверхэкспрессия генов *tHMG1*, *ERG1*, *ERG9* и одновременное инактивирование генов *GAL1* и *GAL80* в хромосоме дрожжевого штамма *Saccharomyces cerevisiae* JDY52 позволили в условиях 5 л ферментера с добавлением 40 г/л глюкозы получить  $606,9 \pm 9,1$  мг/л ОК через 144 ч, что на данный момент является наилучшим результатом (Zhao *et al.*, 2018). В другой работе использование штамма дрожжевых грибов *Yarrowia lipolytica* ATCC 201249 со сверхэкспрессированными *ERG1*, *ERG9*, *ERG20*, *tHMG1* и модулем экспрессии  $\beta AS$  и *CYP716A2-linker(GSTSSG)-t46ATR1* (ATR1 с отсеченными 46 аминокислотами на N-конце) в условиях 5 л ферментера при внесении 100 г/л глюкозы обеспечивало выход 540,7 мг/л ОК через 82 ч (Li *et al.*, 2020). Несмотря на то, что с использованием дрожжей *S. cerevisiae* JDY52 выход ОК был больше ( $606,9 \pm 9,1$  мг/л) (Zhao *et al.*, 2018), продуктивность *Y. lipolytica* составляла 6,59 мг/л/ч и превосходила таковую *S. cerevisiae* (4,214 мг/л/ч).

Для интенсификации процесса биосинтеза также используются различные техники модификации генома дрожжей. Показано, что экспрессия внедренных растительных генов из *low-copy* или *single-copy* плазмид более эффективна, чем экспрессия из *integrated*, *high-copy* и *multi-copy* плазмид (Moses *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2015). В работе (Moses *et al.*, 2014a) исследована активность штаммов *S. cerevisiae* TM30 и *S. cerevisiae* TM44, полученных из одного штамма включением разных вариаций плазмид. В первом случае, штамм, экспрессирующий *CYP716Y1* и *CYP716A12* для получения самоорганизующегося (*self-processing*) полипротеина, в котором 2 фермента связаны через олигопептид 2A, продуцировал  $\beta$ -амирин (6),

эритродиол (**8**), ОК, олеаноловый альдегид (**9**) и 16 $\alpha$ -гидрокси-олеаноловый альдегид (**10**). Тогда как второй штамм, катализирующий образование 2 самоорганизующихся полипротеинов, один из которых состоял из CYP716Y1 и CYP716A12, а другой – из AtATR1 и UDP-зависимой гликозил-трансферазы UGT73C11, катализировал образование 3-*O*-Glc-эхиноцистовой кислоты (**11**) и 3-*O*-Glc-ОК (**12**) (Рисунок 3).

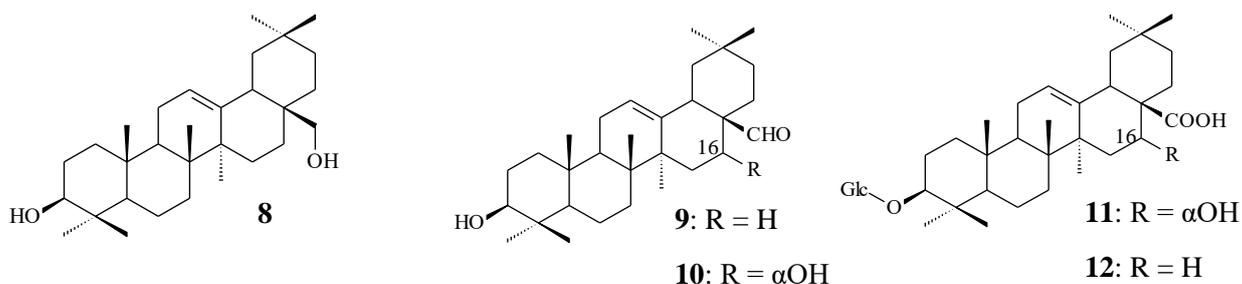


Рисунок 3 – Структурные формулы соединений **8–12**

Наиболее перспективным направлением исследований в данной области является комбинаторный биосинтез, в условиях которого изменение естественного биосинтетического пути или сочетание генов синтеза из различных источников приводит к повышению эффективности микробного биосинтеза или образованию новых соединений. Группой авторов во главе с Т. Moses (2014) исследована С24-окислительная активность выделенных из разных видов растений семейства *Fabaceae* (бобовые) ортологов гена *CYP93E2*. Все полученные штаммы сахаромицетов катализировали образование 24-гидрокси- $\beta$ -амирина (**13**). Практически все штаммы (кроме содержащего *CYP93E7*) параллельно катализировали образование 3 $\beta$ -гидрокси-олеан-12-ен-24-овой кислоты (**14**). При этом наибольшая (79,4%) конверсия  $\beta$ -амирина (**6**) в 24-гидрокси- $\beta$ -амирин наблюдалась при использовании *CYP93E9*-содержащих сахаромицетов (*P. vulgaris*, фасоль обыкновенная) (Moses *et al.*, 2014b). М.Р. Dale с соавт. (2020) было проведено сравнительное исследование каталитической активности 12  $\beta$ AS и 16 ферментов подсемейства CYP716A. Среди изученных  $\beta$ AS наибольшей каталитической активностью ( $10,8 \pm 1,0$  мг/л  $\beta$ -амирина) обладали синтазы, полученные из *Artemisia annua* (полынь

однолетняя) и *Chenopodium quinoa* (киноа). Тогда как среди 16 изученных CYP716A наибольшую активность ( $14,3 \pm 1,6$  мг/л ОК) демонстрировал CYP716AL1 (*C. roseus*, катарантус розовый). При сочетании генов, экспрессирующих образование данных ферментов, выход ОК составлял  $8,5 \pm 0,2$  мг/л. При этом сахаромицеты, содержащие CYP716A75 (*Maesa lanceolata*, ассегаи ложный), CYP716A79 (*C. quinoa*, киноа), CYP716A110 (*Aquilegia coerulea*, водосбор голубой) и CYP716A1 (*A. thaliana*, резуховидка Таля), не катализировали образование ОК, а в посткультуральной жидкости регистрировали присутствие эритродиола (8) и, в первом случае, следовое количество олеанолового альдегида (9) (Dale *et al.*, 2020). Замена генов CYP88D6 (C11-оксидаза) на *Unigene25647* (схожесть 97%) и *ATR1* (*A. thaliana*, резуховидка Таля) на *GuCPR1* (*G. uralensis*, солодка уральская) и включение их в виде комбинации *GuCPR1* и двух кассет *Unigene25647* в геном штамма *S. cerevisiae* SGib привели к образованию  $18,9 \pm 2,0$  мг/л ГК и около 80,0 мг/л 11-оксо- $\beta$ -амирина (15) в условиях 5 л ферментера с добавлением этанола через 144 ч (30 мл каждые 24 ч) вместо ранее полученных  $20,4 \pm 7,7$  мкг/л ГК,  $0,5 \pm 0,1$  мг/л 11-оксо- $\beta$ -амирина (15),  $\beta$ -амирина (6) и следовых количеств 11 $\alpha$ -гидрокси- $\beta$ -амирина (16), 30-гидрокси-11-оксо- $\beta$ -амирина (17) и глицирретальдегида (18) (Zhu *et al.*, 2018). Замена гена CYP716C49 (*C. pinnatifida*, боярышник перистонадрезанный) в штамме *S. cerevisiae* ВУ-ОА на гомолог (схожесть 47,9%) *CaCYP716C49* (*C. asiatica*, центелла азиатская), позволила получить 384,3 мг/л маслиновой кислоты (19, 2 $\alpha$ -гидрокси-ОК) через 96 ч в условиях 5 л ферментера с внесением глюкозы (5 г/л). Тогда как с использованием в тех же условиях штамма *S. cerevisiae* ВУ-Т3, содержащего гены *mix-AS*, *VvCYP716A15*, *CPR* и *CaCYP716C49* из разных растительных источников, через 144 ч регистрировали образование 141,0 мг/л корозоловой кислоты (20, 2 $\alpha$ -гидрокси-УК) (Dai *et al.*, 2019). В работе (Fukushima *et al.*, 2013) была исследована активность различных сочетаний CYP450 из *M. truncatula* (люцерна усеченная). Основными продуктами синтеза в разных случаях являлись сойясапогенол Б (21), гипсогеновая кислота (22) или 11-

деоксо-ГК (**23**). Интересно, что сахаромидеты, экспрессирующие *CYP716A12* и *CYP93E2*, катализировали образование 4-*epi*-гедерагенина (**24**), а дрожжи, экспрессирующие *CYP716A12* и *CYP72A63*, – кверетаровой кислоты (**25**), которые ранее не обнаруживались в тканях *M. truncatula*, что свидетельствует о высоком потенциале комбинаторного биосинтеза с использованием микроорганизмов (Fukushima *et al.*, 2013) (Рисунок 4).

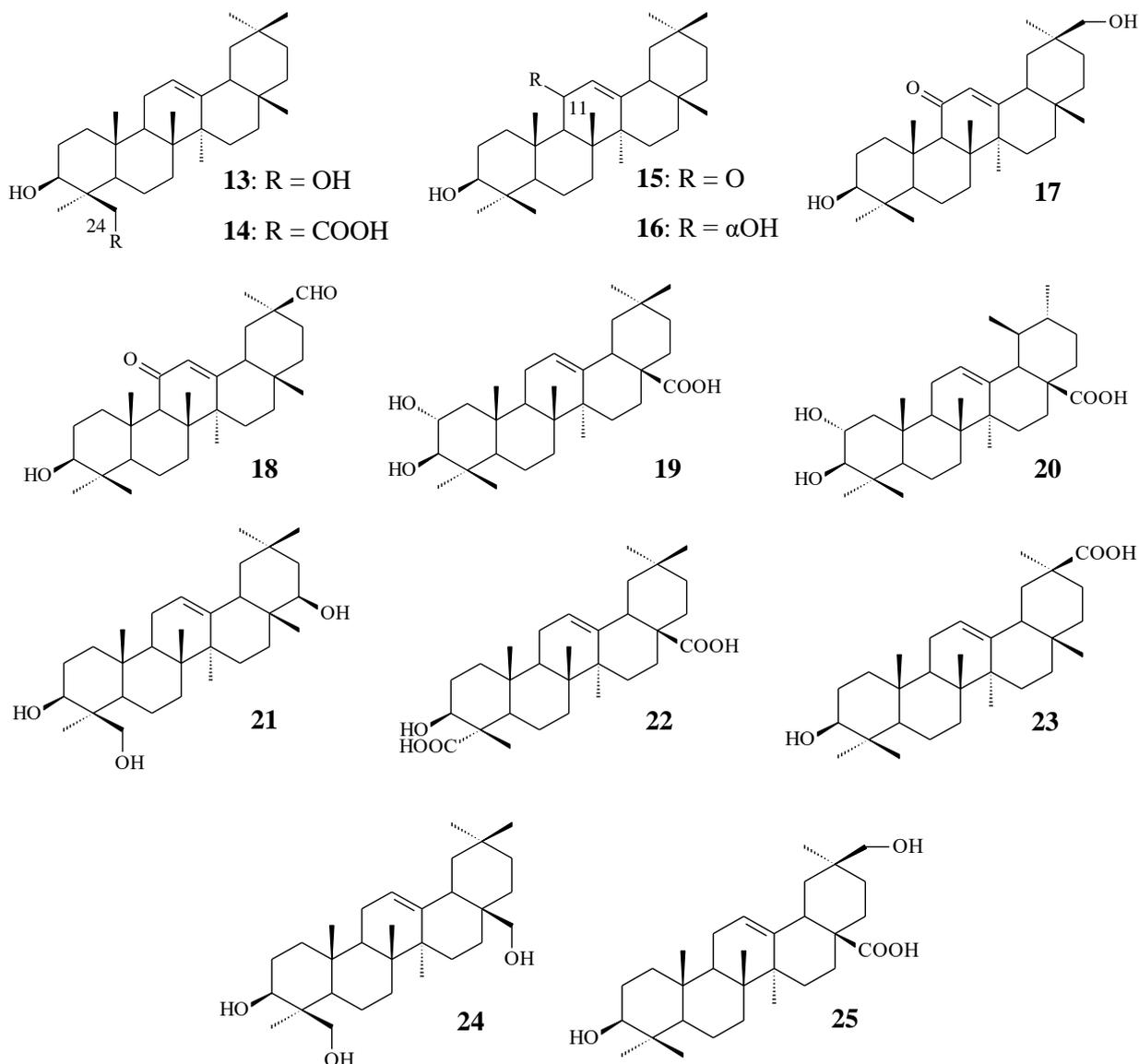


Рисунок 4 – Структурные формулы соединений **13–25**

Таблица 2 – Биосинтез пентациклических тритерпеноидов с использованием генетически модифицированных дрожжей

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	Вставка $\beta AS$ , <i>CPR</i> ( <i>Lotus japonicus</i> ), <i>CYP93E2</i> и <i>CYP72A61</i> ( <i>Medicago truncatula</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6**</b> , 1,07 мг/л), 24-гидрокси- $\beta$ -амирин ( <b>13</b> , 0,27 мг/л) и соясапогенол Б ( <b>21</b> , 1,35 мг/л)	Fukushima <i>et al.</i> , 2013
	Вставка $\beta AS$ , <i>CPR</i> ( <i>L. japonicus</i> ), <i>CYP716A12</i> и <i>CYP72A68</i> ( <i>M. truncatula</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 0,55 мг/л), эритродиол ( <b>8</b> , 0,09 мг/л) и гипсогеновая кислота ( <b>22</b> , 0,96 мг/л)	
	Вставка $\beta AS$ , <i>CPR</i> ( <i>L. japonicus</i> ), <i>CYP716A12</i> и <i>CYP93E2</i> ( <i>M. truncatula</i> )	Эритродиол ( <b>8</b> ), ОК, 4- <i>epi</i> -гедерагенин ( <b>24</b> ) и др. (следовые количества)	
	Вставка $\beta AS$ , <i>CPR</i> ( <i>L. japonicus</i> ), <i>CYP72A63</i> и <i>CYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> )	Эритродиол ( <b>8</b> ), ОК, кверетаровая кислота ( <b>25</b> ) и др. (следовые количества)	
	Вставка $\beta AS$ , <i>CPR</i> ( <i>L. japonicus</i> ), <i>CYP93E2</i> и <i>CYP72A63</i> ( <i>M. truncatula</i> )	Предположительно 11-деоксо-ГК ( <b>23</b> ) и др. (следовые количества)	
<i>S. cerevisiae</i> BY4742	Вставка $\beta AS$ ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 36,2 ± 3,9 мг/л)	Moses <i>et al.</i> , 2014a
	Вставка $\beta AS$ ( <i>M. truncatula</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 19,0 ± 1,0 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> TM3	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ), <i>CYP716Y1</i> ( <i>Vupleurum falcatum</i> ) и <i>CYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> ), эритродиол ( <b>8</b> ), ОК ( <b>1</b> ), олеаноловый альдегид ( <b>9</b> ) и 16 $\alpha$ -гидрокси-олеаноловый альдегид ( <b>10</b> )	
	Вставка <i>CYP716Y1</i> ( <i>B. falcatum</i> ), <i>CYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ), <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>UGT73C11</i> ( <i>Barbarea vulgaris</i> )	3- <i>O</i> -Glc-Эхиноцистовая кислота ( <b>11</b> ), 3- <i>O</i> -Glc-ОК ( <b>12</b> )	

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
<i>S. cerevisiae</i> ТМЗ	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E2</i> ( <i>M. truncatula</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 1,3%)	Moses <i>et al.</i> , 2014b
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E7</i> ( <i>Lens culinaris</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 16,2%)	
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E8</i> ( <i>Pisum sativum</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 37,6%), предположительно 3β-гидрокси-олеан-12-ен-24-овая кислота ( <b>14</b> , 3,2%)	
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E5</i> ( <i>Cicer arietinum</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 51,3%), предположительно 3β-гидрокси-олеан-12-ен-24-овая кислота ( <b>14</b> , 7,6%)	
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E6</i> ( <i>G. glabra</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 50,2%), предположительно 3β-гидрокси-олеан-12-ен-24-овая кислота ( <b>14</b> , 6,3%)	
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E4</i> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 47,0%), предположительно 3β-гидрокси-олеан-12-ен-24-овая кислота ( <b>14</b> , 5,5%)	
	Вставка <i>AtATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E1</i> ( <i>Glycine max</i> )	24-Гидрокси-β-амирин ( <b>13</b> , 59%), предположительно 3β-гидрокси-олеан-12-ен-24-овая кислота ( <b>14</b> , 13,5%)	

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
	Вставка <i>AtATRI</i> ( <i>A. thaliana</i> ) и <i>CYP93E9</i> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	24-Гидрокси- $\beta$ -амирин ( <b>13</b> , 67,6%), предположительно 3 $\beta$ -гидрокси-олеан-12-ен-24- овая кислота ( <b>14</b> , 11,8%)	
<i>S. cerevisiae</i> BY4742	Удаление <i>TRP1</i>	Сквален ( <b>4</b> , 9,6 мг/л)	Dai <i>et al.</i> , 2014
<i>S. cerevisiae</i> BY4742- TRP	Сверхэкспрессия <i>tHMG1</i> и <i>LYS2</i>	Сквален ( <b>4</b> , 150,9 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> BY-T1	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> ) Сверхэкспрессия <i>ERG1</i> и <i>ERG9</i>	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 107,0 мг/л), сквален ( <b>4</b> , 183,4 мг/л)	
	Вставка $\beta AS$ ( <i>Panax ginseng</i> ) Сверхэкспрессия <i>ERG1</i> и <i>ERG9</i>	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 1,9 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> BY- $\beta A$ -G	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> ), <i>OAS</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>AtCPR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 71,0 мг/л), $\beta$ -амирин ( <b>6</b> , 88.6 мг/л), и сквален ( <b>4</b> , 141,2 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 4,16 мг/л)	Zhang <i>et al.</i> , 2015
	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> ) и <i>ERG1</i> ( <i>Cuida albicans</i> )	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 24,50 мг/л)	
	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> ), <i>ERG1</i> ( <i>C. albicans</i> ), <i>IDI</i> ( <i>E. coli</i> ) Сверхэкспрессия <i>ERG9</i> и <i>ERG20</i>	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 36,50 мг/л, 75,50 мг/л*)	

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
	Вставка $\beta AS$ ( <i>G. glabra</i> ), <i>ERG1</i> ( <i>C. albicans</i> ), <i>IDI</i> ( <i>E. coli</i> ) Сверхэкспрессия <i>ERG9</i> и <i>ERG20</i> Повторная вставка <i>SRE</i> в промотор	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 85,78 мг/л, 108,60 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> W303-1a	Сверхэкспрессия <i>tHMG1</i> и <i>ERG20</i>	Сквален ( <b>4</b> , 165,28 мг/л)	Lu <i>et al.</i> , 2018
<i>S. cerevisiae</i> WTE	Вставка <i>mix-AS</i> ( <i>Catharanthus roseus</i> ) Сверхэкспрессия <i>tHMG1</i> и <i>ERG20</i>	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 1,64 мг/л), $\alpha$ -амирин ( <b>7</b> , 5,64 мг/л)	
	Вставка <i>mix-AS</i> ( <i>Catharanthus roseus</i> ) и <i>ERG1</i> ( <i>C. albicans</i> ) Сверхэкспрессия <i>tHMG1</i>	$\beta$ -Амирин ( <b>6</b> , 24,95 мг/л, 44,92 мг/л*), $\alpha$ -амирин ( <b>7</b> , 97,31 мг/л, 175,15 мг/л*)	
<i>S. cerevisiae</i> ScLCZ08	Вставка <i>CrOAS</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>AtCPRI</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 29,49 мг/л), УК ( <b>3</b> , 24,58 мг/л)	
	Вставка <i>MtOAS</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>LjCPRI</i> ( <i>L. japonicus</i> )	ОК ( <b>1</b> , 24,34 мг/л), УК ( <b>3</b> , 23,37 мг/л)	
	Вставка <i>CrOAS</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>LjCPRI</i> ( <i>L. japonicus</i> )	ОК ( <b>1</b> , 23,91 мг/л), УК ( <b>3</b> , 22,96 мг/л)	
	Вставка <i>MtOK S</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>AtCPRI</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 31,41 мг/л, 155,58 мг/л*), УК ( <b>3</b> , 25,85 мг/л, 123,37 мг/л*)	
<i>S. cerevisiae</i> JDY52	Вставка <i>Gg<math>\beta AS</math></i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>AtCPRI</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 2,5 $\pm$ 0,2 мг/л)	Zhao <i>et al.</i> , 2018

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>LjCPR</i> ( <i>L. japonicus</i> )	ОК (1, 6,3 ± 0,3 мг/л)	
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>GuCPR</i> ( <i>G. uralensis</i> )	ОК (1, 7,1 ± 0,5 мг/л)	
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> и <i>MtCPR</i> ( <i>M. truncatula</i> )	ОК (1, 9,0 ± 0,7 мг/л)	
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> и <i>MtCPR</i> ( <i>M. truncatula</i> ) Выключение <i>GAL1</i>	ОК (1, 41,3 ± 3,4 мг/л)	
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> и <i>MtCPR</i> ( <i>M. truncatula</i> ) Выключение <i>GAL1</i> и <i>GAL80</i>	ОК (1, 70,3 ± 7,0 мг/л)	
	Вставка <i>GgβAS</i> ( <i>G. glabra</i> ), <i>MtCYP716A12</i> и <i>MtCPR</i> ( <i>M. truncatula</i> ) Выключение <i>GAL1</i> и <i>GAL80</i> Сверхэкспрессия <i>tHMG1</i> , <i>ERG1</i> , <i>ERG9</i>	ОК (1, 186,1 ± 12,4 мг/л, 606,9 ± 9,1 мг/л*)	

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	Вставка <i>CYP88D6</i> , <i>CYP72A154</i> ( <i>G. uralensis</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ГК ( <b>2</b> , 20,4 ± 7,7 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 0,5 ± 0,1 мг/л), β-амирин ( <b>6</b> , 21,23 ± 1,64 мг/л), 11α-гидрокси-β-амирин ( <b>16</b> ), 30-гидрокси-11-оксо-β-амирин ( <b>17</b> ) и глицерратальдегид ( <b>18</b> ) (следовые количества)	Zhu <i>et al.</i> , 2018
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1 (диплоид)	Вставка <i>CYP88D6</i> , <i>CYP72A154</i> ( <i>G. uralensis</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ГК ( <b>2</b> , 31,8 ± 6,6 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 0,5 ± 0,06 мг/л)	
<i>S. cerevisiae</i> SGib	Вставка <i>CYP88D6</i> , <i>CYP72A154</i> ( <i>G. uralensis</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ГК ( <b>2</b> , 33,7 ± 7,4 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 7,5 ± 0,5 мг/л)	
	Вставка <i>CYP88D6</i> и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 3,1 ± 0,05 мг/л)	
	Вставка <i>Unigene25647</i> и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 6,0 ± 0,1 мг/л)	
	Вставка <i>CYP72A63</i> , <i>Unigene25647</i> ( <i>G. uralensis</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ГК ( <b>2</b> , 40,9 ± 6,4 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 9,16 ± 1,20 мг/л)	
	Вставка <i>CYP72A154</i> , <i>Unigene25647</i> ( <i>G. uralensis</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ГК ( <b>2</b> , 42,3 ± 5,8 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 7,22 ± 1,58 мг/л)	
	Вставка <i>CYP72A154</i> , <i>Unigene25647</i> и <i>GuCPRI</i> ( <i>G. uralensis</i> )	ГК ( <b>2</b> , 517,4 ± 35,5 мкг/л), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 15,3 ± 1,6 мг/л)	
	Вставка <i>CYP72A63</i> , <i>Unigene25647</i> и <i>GuCPRI</i> ( <i>G. uralensis</i> )	ГК ( <b>2</b> , 7,4 ± 1,0 мг/л, 18,9 ± 2,0 мг/л*), 11-оксо-β-амирин ( <b>15</b> , 22,6 ± 0,9 мг/л, ~80 мг/л*)	

## Продолжение таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
<i>S. cerevisiae</i> ВУ-ОК	Вставка <i>CYP716C49</i> ( <i>Crataegus pinnatifida</i> )	Маслиновая кислота ( <b>19</b> , 0,06 мг/л/ОП <sub>600</sub> )	Dai <i>et al.</i> , 2019
	Вставка <i>CaCYP716C49</i> ( <i>Centella asiatica</i> )	Маслиновая кислота ( <b>19</b> , 0,2 мг/л/ОП <sub>600</sub> )	
	Вставка кодон-оптимизированного <i>CaCYP716C49</i> ( <i>C. asiatica</i> )	Маслиновая кислота ( <b>19</b> , 0,45 мг/л/ОП <sub>600</sub> , 384,3 мг/л*)	
	Вставка <i>mix-AS</i> ( <i>Eriobotrya japonica</i> ), <i>VvCYP716A15</i> и <i>CPR</i> ( <i>Vitis vinifera</i> )	УК ( <b>3</b> , 1,76 мг/л/ОП <sub>600</sub> ), ОК ( <b>2</b> , 0,61 мг/л/ОП <sub>600</sub> )	
	Вставка <i>mix-AS</i> ( <i>E. japonica</i> ), кодон-оптимизированного <i>CaCYP716C49</i> ( <i>C. asiatica</i> ), <i>VvCYP716A15</i> и <i>CPR</i> ( <i>V. vinifera</i> )	Корозоловая кислота ( <b>20</b> , 0,39 мг/л/ОП <sub>600</sub> , 141,0 мг/л*)	
<i>S. cerevisiae</i> ВУ4742	Вставка <i>AaβAS</i> ( <i>Artemisia annua</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 10,8 ± 1,0 мг/л)	Dale <i>et al.</i> , 2020
	Вставка <i>CqβAS</i> ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 10,8 ± 1,0 мг/л)	
	Вставка <i>PtβAS</i> ( <i>Polygala tenuifolia</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 9,0 ± 0,7 мг/л)	
	Вставка <i>LjβAS</i> ( <i>L. japonicus</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 8,2 ± 1,0 мг/л)	
	Вставка <i>EtβAS</i> ( <i>Euphorbium tirucalli</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 8,0 ± 0,2 мг/л)	
	Вставка <i>SlβAS</i> ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 2,9 ± 0,3 мг/л)	
	Вставка <i>CYP716AL1</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>ATR2</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 14,3 ± 1,6 мг/л), эритродиол ( <b>8</b> ) и олеаноловый альдегид ( <b>9</b> ) (следовые количества)	
	Вставка <i>CYP716A52v2</i> ( <i>P. ginseng</i> ) и <i>ATR2</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 3,0 ± 0,0 мг/л), эритродиол ( <b>8</b> ) и олеаноловый альдегид ( <b>9</b> ) (следовые количества)	

## Окончание таблицы 2

Исходный штамм	Модификации	Продукты (выход)	Источник
	Вставка <i>S1βAS</i> ( <i>S. lycopersicum</i> ), <i>CYP716AL1</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>ATR2</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 3,9 ± 0,2 мг/л)	
	Вставка <i>S1βAS</i> ( <i>S. lycopersicum</i> ), <i>CYP716A52v2</i> ( <i>P. ginseng</i> ) и <i>ATR2</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 2,8 ± 0,0 мг/л)	
	Вставка <i>AaβAS</i> ( <i>A. annua</i> ), <i>CYP716AL1</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>ATR2</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 8,5 ± 0,2 мг/л)	
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 201249	Вставка <i>βAS</i> ( <i>C. roseus</i> )	β-Амирин ( <b>6</b> , 16,0 мг/л)	Li <i>et al.</i> , 2020
	Вставка <i>βAS</i> ( <i>C. roseus</i> ), <i>CYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ), и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> )	ОК ( <b>1</b> , 16,3 мг/л)	
	Вставка <i>βAS</i> ( <i>C. roseus</i> ), <i>CYP716A12</i> ( <i>M. truncatula</i> ) и <i>ATR1</i> ( <i>A. thaliana</i> ) Сверхэкспрессия <i>ERG1</i> , <i>ERG9</i> , <i>ERG20</i> , <i>tHMG1</i>	ОК ( <b>1</b> , 92,1 мг/л)	
	Вставка <i>βAS</i> ( <i>C. roseus</i> ) и <i>CYP716A2-linker</i> ( <i>GSTSSG</i> )- <i>t46ATR1</i> Сверхэкспрессия <i>ERG9</i> , <i>ERG20</i> , <i>tHMG1</i>	ОК ( <b>1</b> , 129,9 мг/л, 540,7 мг/л*)	

Примечание. \*Выход вещества в ферментере с объемом сосуда 5 л. \*\*Жирным шрифтом указан номер структурной формулы вещества.

### 1.3. Биологическая активность тритерпеновых кислот и их нативных производных

Экстракты, выделенные из растительных источников с помощью различных растворителей и содержащие целевые пентациклические тритерпеноиды, как правило, характеризуются широким спектром биологических свойств. Метанольные тритерпеноид-содержащие экстракты, полученные из различных частей *Betula pendula* (береза повислая), обладают антибактериальной активностью в отношении бактериальных тест-культур *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (Duric *et al.*, 2013). Метанольные экстракты из надземной части тропического растения *Baccharis uncinella* (бакхарис), содержащие ОК и УК, проявляют антипаразитарную активность, ограничивая развитие форм промастигота и амастигота *Leishmania amazonensis* (лейшмания амазонская), и усиливают иммунный ответ зараженных мышей (Yamamoto *et al.*, 2014). Этилацетатная фракция экстракта корней *Glycyrrhiza uralensis* (солодка уральская) подавляет TNF- $\alpha$ -индуцированную активацию NF- $\kappa$ B в HepG2 клетках (Chen *et al.*, 2014). Этилацетатная фракция экстракта корней *Potentilla fulgens* (лапчатка молочная), содержащая тритерпеноиды урсанового ряда, проявляет антиоксидантную активность за счет ингибирования выработки свободных радикалов (Choudhary *et al.*, 2013). Спиртовой экстракт и этилацетатная фракция околоцветника *Fragaria ananassa* (земляника ананасная), содержащие тритерпеноиды, проявляют выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток меланомы B16-F10 и ингибируют их меланогенез на 79,1 и 80,2% соответственно (Song *et al.*, 2013). Аллелопатическое действие (ингибирование созревания семян и роста корней близлежащих растений) *Alstonia scholaris* (алстония малабарская) обусловлено в том числе высоким ( $2,5 \pm 0,6$  мг/г сухого веса листьев) содержанием УК (Wang *et al.*, 2014).

Возможность выделения тритерпеновых кислот в индивидуальном виде позволяет детально изучить их биоактивные свойства и таким образом

объяснить фармакологические свойства некоторых растений. Так, антибактериальные свойства коры берёзы обусловлены повышенным содержанием в ней пентациклических тритерпеноидов, в частности ОК, которая проявляет выраженную антибактериальную активность в отношении *S. aureus* (МПК 1,25%) и *B. subtilis* (МПК 0,625%) (Duric *et al.*, 2013). Антимикробная активность ГК заключается в способности снижать подвижность клеток *P. aeruginosa* ATCC 25619 и уровень их биопленкообразования, что может внести значительный вклад в разработку действенной терапии псевдомонадных инфекций без применения антибиотиков (Kannan *et al.*, 2019). Использование *in vitro* УК дозозависимо подавляет рост *M. tuberculosis* (Jyoti *et al.*, 2015) и ингибирует репликацию ротавируса (Tohmé *et al.*, 2019). Кроме того, в исследованиях *in silico* показана возможность использования ОК и УК в качестве ингибиторов протеазы SARS-CoV-2, ключевого фермента процесса репликации вируса (Kumar *et al.*, 2020; Sampangi-Ramaiah *et al.*, 2020).

ОК, как притовоопухолевый агент, способствует повышению чувствительности клеток саркомы мягких тканей человека к лекарственным препаратам (Villar *et al.*, 2014). УК обладает сходными свойствами и в химиотерапии колоректального рака значительно увеличивает ее эффективность и снижает побочные эффекты в исследованиях *in vitro* и *in vivo* (Shan *et al.*, 2016). Цитотоксический эффект экстракта околоцветника *Fragaria ananassa* в отношении клеток меланомы B16-F10 обусловлен в том числе присутствием цитотоксичной УК, подавляющей выработку меланина на 40,2% (Song *et al.*, 2013). Кроме того, УК снижает распространение клеток миеломы человека путем ингибирования деубиквитинирующей протеазы USP7 (Jing *et al.*, 2018), а также вызывает апоптоз клеток рака желудка путем активации каспаз, поли(АДФ-рибоза) полимеразы и индукции образования активных форм кислорода (Zhang *et al.*, 2019).

Гепатопротекторная активность ОК обусловлена ее ингибирующим действием в отношении карбоксилэстеразы (терапевтическая мишень при гипертриглицеридемии), а также вируса гепатита С (Yu *et al.*, 2013; Zou *et al.*,

2017). ГК проявляет гепатопротекторный эффект за счет ингибирования процесса образования NO в гепатоцитах крыс, подавления экспрессии генов *iNOS* и *COX-2* и снижения активности транскрипционного фактора NF-κB в клетках HepG2 (Chen *et al.*, 2014). А способность ГК стимулировать нейропротекторное свойство микроглии и подавлять сигнальный путь MAPK центральной нервной системы обуславливает снижение тяжести протекания экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей (Zhou *et al.*, 2015). В то время как УК может выступать эффективным антидиабетическим агентом за счет способности ингибировать активность α-глюкозидазы (Wang *et al.*, 2013). ОК и УК проявляют ингибирующий эффект в отношении липополисахарид-индуцированной выработки NO в клетках RAW 264,7, что обуславливает их противовоспалительное действие (Feng *et al.*, 2018).

Наряду с исходными кислотами, их нативные производные также проявляют выраженную биологическую активность. Так, выделенные из экстракта надземной части *Lantana camara* (лантана сводчатая) производные ОК – 22β-ацетокси-3,25-эпокси-3α-гидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота (**26**) и метил 3,25-эпокси-3α-гидрокси-11-оксо-22β-сенециоолеан-12-ен-28-оат (**27**) проявляют антибактериальные свойства в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Ayub *et al.*, 2019) (Рисунок 5).

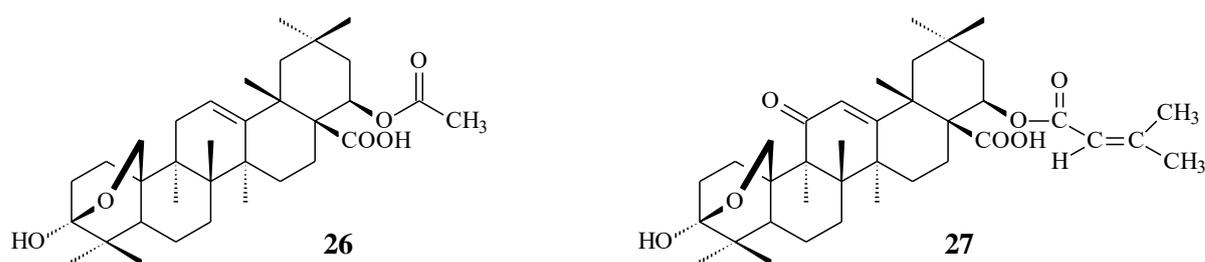


Рисунок 5 – Структурные формулы соединений **26** и **27**

Олеанановые 27-карбоксы производные (**28–30**), выделенные из *Chrysosplenium carnosum* (селезёночник), проявляют выраженную ингибирующую активность в отношении линий клеток меланомы мышей B16F10 и SP2/0 (Lu *et al.*, 2013). Природное 2α-гидроксилированное производное ОК (**20**, корозоловая кислота) проявляет цитотоксическую

активность в отношении клеток CaSki (рак шейки матки человека) посредством индукции апоптоза, остановки клеточного цикла в фазе G2/M и ингибирования PI3K/Akt сигнального пути (Xu *et al.*, 2016). 2,3-секо-Производное урсанового типа (**31**) из *Siphonodon celastrineus* (сифонодон бересклетовый) демонстрирует выраженную цитотоксическую активность в отношении раковых клеток лейкемии MOLT-3 (Kaweetripob *et al.*, 2013) (Рисунок 6).

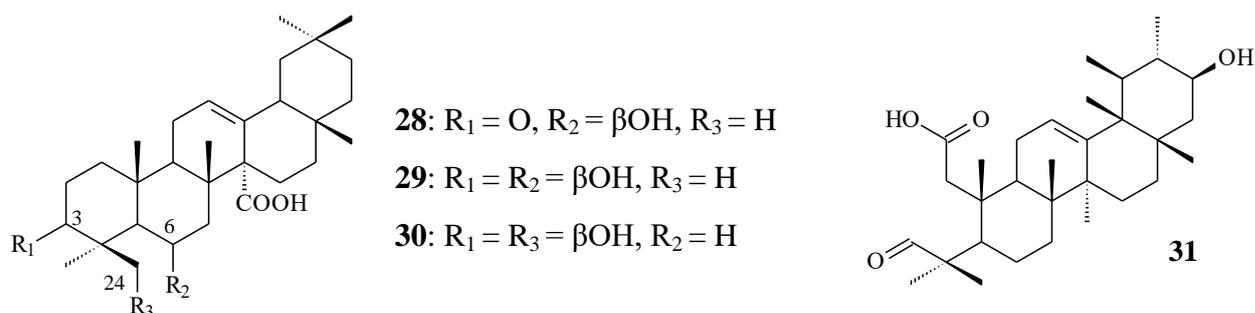


Рисунок 6 – Структурные формулы 28–31

Олеанановые производные из *Panax stipuleanatus* (женьшень прилистниковый) C3, C28-дигликозиды (**32–34**) и *Astilbe rivularis* (астильбе приречная) 3 $\beta$ -*транс*-*p*-кумароилокси-олеан-12-ен-27-овая кислота (**35**) и 6 $\beta$ -гидрокси-3-оксоолеан-12-ен-27-овая кислота (**36**), а также олеанановые и урсановые полигидроксилированные производные (**37–40**) из *Rosa laevigata* (шиповник гладкий) обладают противовоспалительным действием (Liang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2016), в том числе за счет подавления TGF $\beta$ 1 $\alpha$ -опосредованной гиперпроницаемости *in vitro* и *in vivo* (Kang *et al.*, 2016) (Рисунок 7). Показано, что урсановые производные из *Durio zibethinus* (дуриан цибетиновый) обладают более выраженным противовоспалительным действием в тесте ингибирования LPS-индуцированной NO продукции в RAW 264,7 клетках по сравнению с тритерпеноидами олеананового типа, снижению активности которых способствует C2 гидроксильное окисление (Feng *et al.*, 2018).

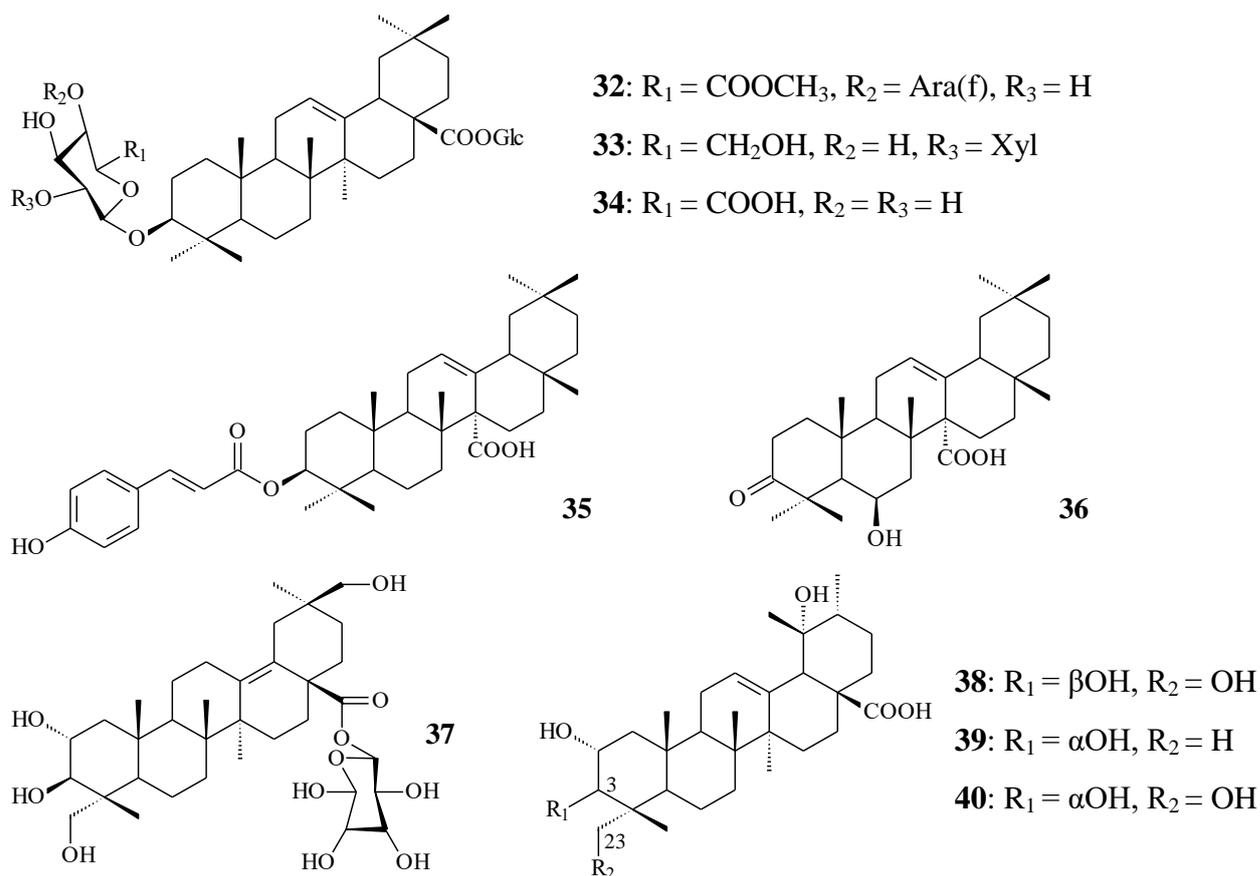


Рисунок 7 – Структурные формулы соединений **32–40**

Выраженная ингибирующая активность экстрактов корней *Cecropia telentida* (цекропия) в отношении  $11\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназы 1 может быть обусловлена присутствием нового, предположительно,  $2\alpha,20\beta$ -дигидроксипроизводного УК (**41**, изоярумовая кислота) (Mosquera *et al.*, 2018). Выделенные из *Potentilla fulgens* (лапчатка молочная)  $2,3$ -дигидроксипроизводные урсанового типа фульговые кислоты А (**42**) и Б (**43**) проявляют антиоксидантное действие, ингибируя образование свободных радикалов (Choudhary *et al.*, 2013). Противовирусная, антибактериальная, гепатопротекторная, противовоспалительная и противоопухолевая активность экстрактов корней широко распространенных в Китае лекарственных растений *Vupleurum chinense* (володушка китайская) и *B. scorzonerifolium* (володушка козелецелистная) обеспечивается в том числе за счет присутствия в них биоактивных сайкосапонинов олеананового типа (**44–46**) (Yang *et al.*, 2017) (Рисунок 8).

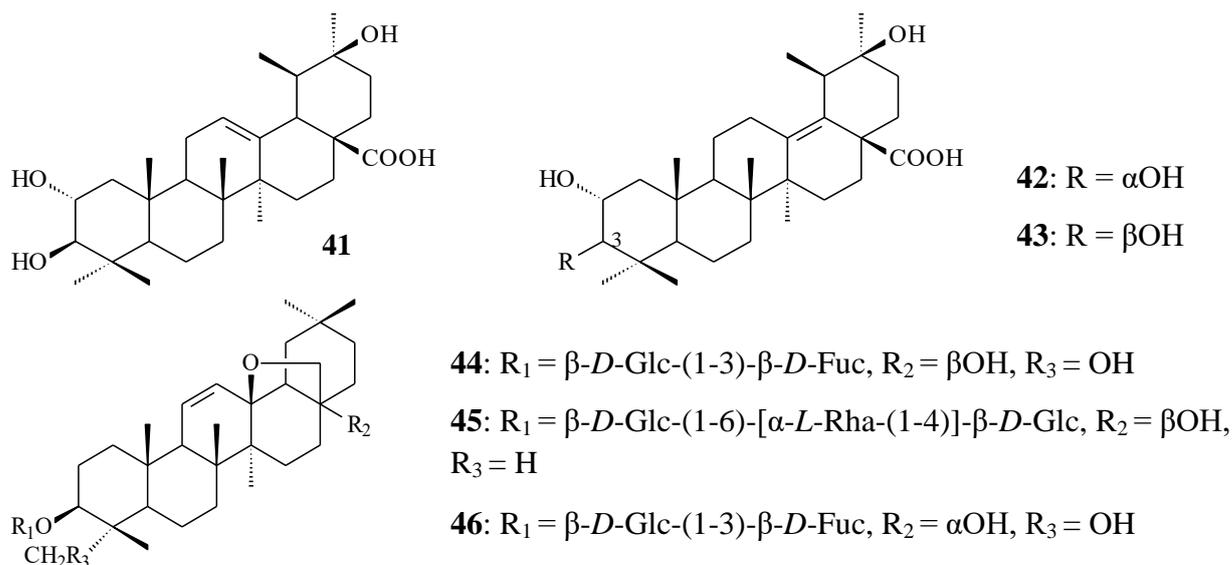


Рисунок 8 – Структурные формулы соединений **41–46**

В связи с широким распространением и доступностью обсуждаемых пентациклических тритерпеновых кислот они часто используются в качестве платформы для создания различных полусинтетических производных, обладающих антибактериальной (Huang *et al.*, 2014), противовирусной (Yu *et al.*, 2013; Grishko *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2019), противовоспалительной (Ishida *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017), гепатопротекторной (Zou *et al.*, 2017), противоопухолевой (Mendes *et al.*, 2016; Wiemann *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2016; Alho *et al.*, 2019) и др. активностью. Изучению биологической активности синтетических производных посвящено большое количество специализированных обзоров, обобщающих информацию как по производным отдельных кислот (Ayeleso *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Mlala *et al.*, 2019), так и по обнаруженной у тритерпеновых производных конкретного вида биоактивности (Isah *et al.*, 2016; Hodon *et al.*, 2019; Ren, Kinghorn, 2019).

#### 1.4. Биологическая трансформация

С учетом относительной доступности в природных источниках и высокого уровня биоактивности тритерпеновых кислот, интерес представляет изучение возможности направленной трансформации данных тритерпеноидов с

целью повышения их биодоступности и расширения спектра новых биоактивных соединений. В настоящее время наиболее апробированы и используются для трансформации кислот **1–3** химические методы, которые зачастую требуют поддержания экстремального уровня показателей кислотности и температуры, применения дорогостоящих катализаторов или защитных групп реакционно-активных центров молекул (Grishko *et al.*, 2014; Parida *et al.*, 2014; Chouaïb *et al.*, 2015; Alho *et al.*, 2019). Биологические процессы трансформации тритерпеноидов, в отличие от химических, не предполагают введения защитных групп и использования агрессивных реагентов и могут протекать в нормальных условиях среды. Кроме того, микроорганизмы способны катализировать широкий спектр регио- и стереоселективных реакций, которые затруднительно провести химическим путем (Shah *et al.*, 2014).

Одним из высокоэффективных способов повышения биодоступности и раскрытия фармакологического потенциала нативных пентациклических тритерпеноидов является направленная их функционализация путем полигидроксилирования. Такие функционализированные производные, гидроксилированные растительными P450-зависимыми монооксигеназами (Ghosh, 2017), широко распространены в природе, однако, как правило, встречаются в следовых количествах или находятся в составе трудноразделимой смеси. Использование ферментативной активности микроорганизмов для трансформации пентациклических тритерпеноидов позволяет получать гидроксилированные производные с высоким уровнем выхода и региоселективности. Кроме того, процесс микробного гидроксилирования протекает не только в кольце А, но и труднодоступных положениях колец В, D и E. Помимо гидроксилирования, микробная функционализация пентациклических тритерпеноидов может проходить посредством реже встречающихся реакций карбоксилирования, гликозилирования, образования лактонов и др.

### 1.4.1. Грибная трансформация

Биотрансформация обсуждаемых соединений зачастую протекает с использованием мицелиальных грибов различных видов, принадлежащих к отделам *Ascomycota* (порядки *Glomerellales*, *Hypocreales*) и *Zygomycota* (порядок *Mucorales*). Грибная биоконверсия исходных соединений сопровождается образованием производных с гидроксигруппами при С1, С7, С15, С21, С24 или С30 атомах, кетогруппами при С3, С7 или С21, глюкопиранозид-группами при С3, С28 или С30, лактон-группами при С28/С13 или С3/С4 и др., а также фрагментацией кольца А. Как правило, концентрация кислот, используемая в экспериментах по биотрансформации, колеблется от 0,02 до 1,0 г/л. Конечный выход (от 1,0 до 77,5%) продуктов трансформации и продолжительность (от 2 до 20 сут) процесса индивидуальны и зависят от использованного грибного катализатора.

Использование штамма *Rhizomucor miehei* СЕСТ 2749 широко распространенных в природе грибов приводило к частичной метаболизации в течение 13 сут ОК (~0,5 г/л) с образованием эквивалентного количества (5,0–6,0%) 1 $\beta$ ,30-дигидрокси-ОК (**47**), 7 $\beta$ ,30-дигидрокси-ОК (**48**) и 30-гидрокси-ОК (**25**) (Martinez *et al.*, 2013) (Рисунок 9). Соединение **25**, известное как кверетаровая кислота, впервые было выделено из произрастающих на территории Мексики кактусов *Lemaireocereus queretaroensis* и *L. beneckeii* (Djerassi *et al.*, 1956). Данное соединение обладает умеренной противоопухолевой активностью в отношении клеток HeLa (рак шейки матки) (Kinoshita *et al.*, 1999). Ранее кверетаровая кислота **25** (3,3%) была получена при трансформации ОК (0,2 г/л) в течение 24 ч клетками *E. coli*, экспрессирующими гены цитохром Р450 *toxA* актиномицетов *Nonomuraea rcticatena* и *Pseudomonas* редокс-партнера *camAB*. При этом использование бесклеточной реакционной системы позволило увеличить выход соединения **25** до 17,0% (Fujii *et al.*, 2006). Трансформация метилового эфира ОК (~0,3 г/л) с помощью штамма *R. miehei* СЕСТ 2749 в течение 13 сут также сопровождалось процессами 7,30-дигидроксилирования и, кроме того, формированием 9(11),12-

диенового фрагмента в кольце С, что приводило к образованию 15,0% соответствующего метил 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,30-тригидрокси-олеан-9(11),12-диен-28-оата (**49**) (Martinez *et al.*, 2015).

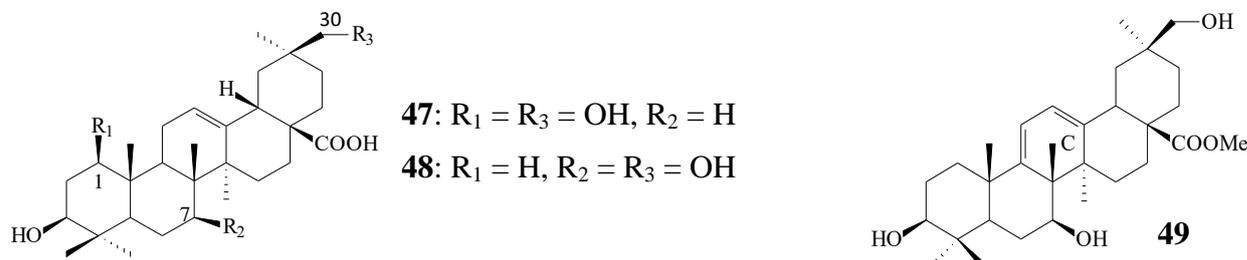


Рисунок 9 – Структурные формулы соединений **47–49**

Ранее было показано, что фитопатогенный микромицет *Colletotrichum lini* AS 3.4486 катализировал С15 гидроксирование ОК с образованием 15 $\alpha$ -гидрокси-ОК (**50**) (Sun *et al.*, 2010). В свою очередь, аскомицеты *Trichothecium roseum* (M 95.56) (Gong *et al.*, 2014) и зигомицеты *Circinella muscae* AS 3.2695 (Yan *et al.*, 2018) катализировали процесс окисления ОК (0,08 г/л и 0,02 г/л соответственно) с образованием 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овой кислоты (**51**) на 6 сут (7,5%) и 7 сут (6,1%) соответственно. При этом из среды биотрансформации *T. roseum* (M 95.56) был дополнительно выделен интермедиат (6,25%) процесса дигидроксилирования – 15 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота (**52**) (Gong *et al.*, 2014); в то время как зигомицетовые грибы *C. muscae* AS 3.2695 одновременно катализировали самые разнообразные реакции гидроксирования и гликозилирования с образованием от 3,1 до 5,8% метаболитов: 7 $\beta$ -гидрокси-ОК (**53**), 7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК (**54**), 7 $\alpha$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК (**55**), 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ОК (**56**), 7 $\beta$ -гидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овой кислоты (**57**), 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ОК 28-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилового эфира (**58**), 21 $\beta$ -гидрокси-ОК 28-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилового эфира (**59**), ОК 28-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозилового эфира (**60**) (Yan *et al.*, 2018) (Рисунок 10). Есть предположение (Yan *et al.*, 2018), что реакции гидроксирования по С7 атому и гликозилирования по С28 атому способствовали увеличению противовоспалительной активности производных,

тогда как гидроксирование по С21 приводило к снижению способности соединений ингибировать липополисахарид-индуцированное выделение оксида азота клетками RAW 264,7.

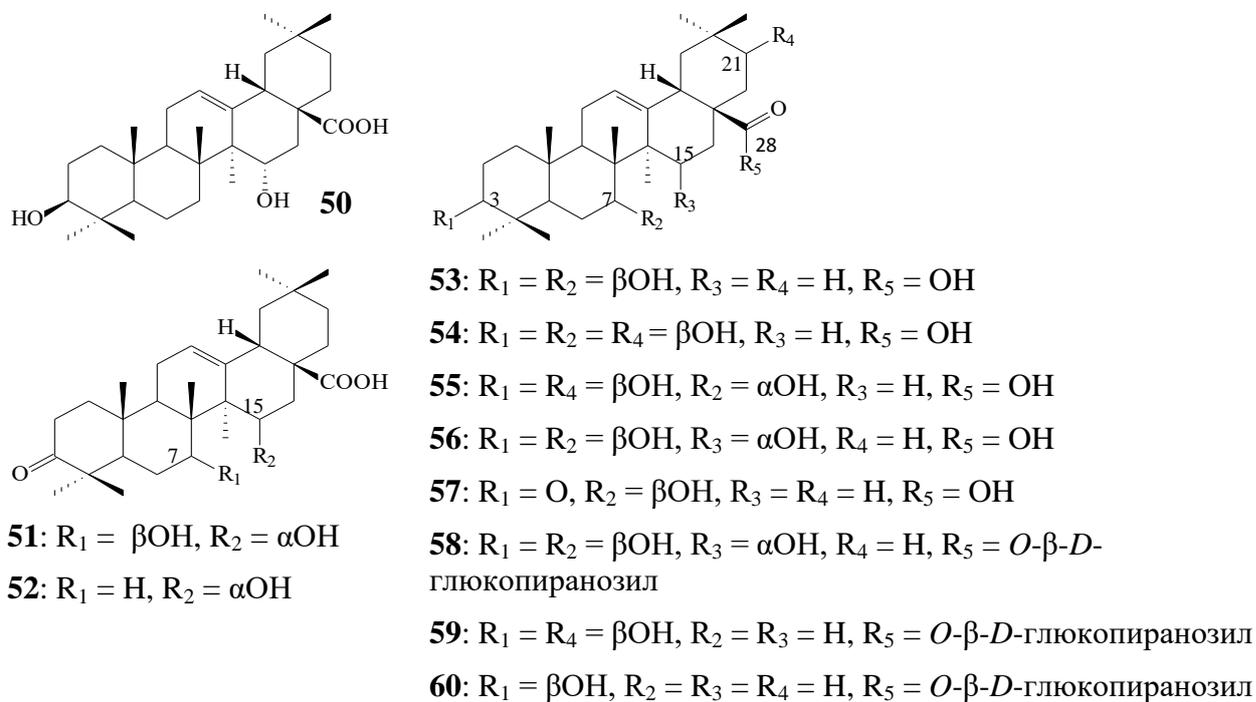


Рисунок 10 – Структурные формулы соединений **50–60**

Штамм *C. muscae* AS 3.2695 был также активен в отношении ГК (~0,06 г/л) и инициировал реакции окисления, ацетилирования и гликозилирования с образованием на 7 сут продуктов, выход которых не превышал 2,5%:  $7\beta$ -гидрокси-ГК (**61**),  $15\alpha$ -гидрокси-ГК (**62**),  $7\beta,15\alpha$ -дигидрокси-ГК (**63**),  $7\beta$ -гидрокси-3,11-диоксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**64**),  $7\beta,15\alpha$ -дигидрокси-3,11-диоксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**65**),  $7\beta$ -гидрокси-11-оксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- $O$ - $\beta$ -D-глюкопиранозид (**66**),  $7\beta$ -гидрокси-11-оксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- $O$ - $\beta$ -D-6'- $O$ -ацетил-глюкопиранозид (**67**),  $15\alpha$ -гидрокси-11-оксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- $O$ - $\beta$ -D-глюкопиранозид (**68**),  $15\alpha$ -гидрокси-11-оксо- $18\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- $O$ - $\beta$ -D-6'- $O$ -ацетил-глюкопиранозид (**69**),  $7\beta$ -гидрокси-ГК 30- $O$ - $\beta$ -D-глюкопиранозид (**70**) (Fan *et al.*, 2019) (Рисунок 11). Все полученные производные ГК в различной степени проявляли ингибирующую активность в отношении LPS-индуцированного выделения NO клетками RAW 264,7. Кроме

того, ранее было показано, что соединения **61** и **64** проявляют противомикробную активность в отношении антибиотикоустойчивого штамма *Enterococcus faecalis* (Qin *et al.*, 2010), а соединение **63** – антиоксидантную и гепатопротекторную активность (Maatooq *et al.*, 2010).

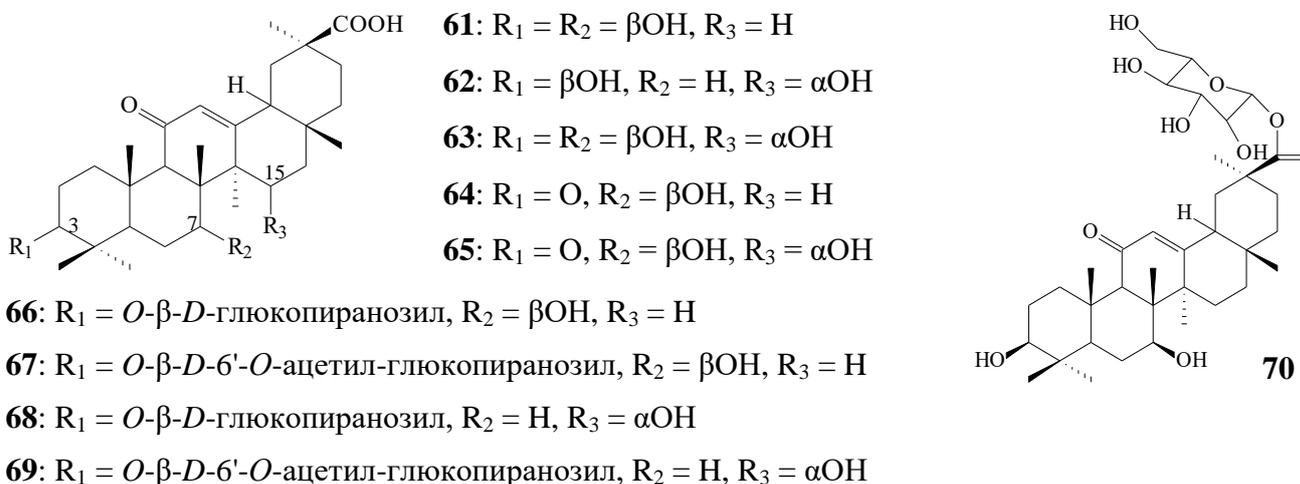


Рисунок 11 – Структурные формулы соединений **61–70**

Этой же группой авторов показано, что зигомизет *Rhizopus arrhizus* AS 3.2893 осуществлял окислительную трансформацию ГК (~0,06 г/л) по C3, C7 и C15 атомам в течение 7 сут с образованием 7 $\beta$ -гидрокси-ГК (**61**), 15 $\alpha$ -гидрокси-ГК (**62**), 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК (**63**), 3 $\beta$ -ацетокси-7 $\beta$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**71**), 7-оксо-ГК (**72**), 7 $\alpha$ -гидрокси-ГК (**73**) и 15 $\alpha$ -гидрокси-7-оксо-ГК (**74**) (при этом выход каждого соединения не превышал 2,8%), которые также проявляли противовоспалительное действие в тесте ингибирования LPS-индуцированной выработки NO в клетках RAW 264,7 (Fan *et al.*, 2019) (Рисунок 12).

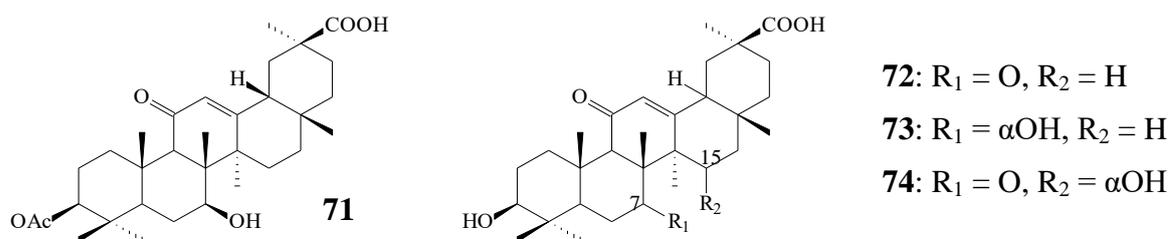


Рисунок 12 – Структурные формулы соединений **71–74**

Биологическое С7 и С15 гидроксирование ГК в концентрации 0,25 г/л (48 ч) и 1,0 г/л (14 сут) с образованием в качестве основного метаболита 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК (**63**) протекало также с участием мицелиальных грибов *Colletotrichum lini* AS 3.4486 (He *et al.*, 2015) и *Absidia pseudocylinderospora* ATCC 24169 (Maatooq *et al.*, 2010) соответственно. При этом *A. pseudocylinderospora* ATCC 24169 в течение длительного культивирования (14 сут) катализировал образование свыше 18,0% соединения (**63**), обладающего антиоксидантной, гепатопротекторной (Maatooq *et al.*, 2010) и противовоспалительной (Fan *et al.*, 2019) активностью.

Препаративная биотрансформация 0,1 г/л ГК грибами *Cunninghamella blakesleana* CGMCC 3.970 в течение 7 сут приводила к образованию смеси продуктов: 15 $\alpha$ ,24-дигидрокси-ГК (**75**), 15 $\alpha$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**76**), 7 $\beta$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**77**), 3,11-диоксо-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,24-тригидрокси-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**78**) и 7 $\alpha$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**79**), при этом выход каждой кислоты не превышал 1,3% (Ma *et al.*, 2017) (Рисунок 13). Было установлено, что соединения **75**, **78** и **79** эффективно ингибируют LPS-индуцированную выработку NO в клетках микроглии мышей со значениями IC<sub>50</sub> 0,76, 0,94 и 0,16 ммоль/л соответственно (Ma *et al.*, 2017). Интересно отметить, что повышение концентрации ГК в среде биотрансформации штамма *C. blakesleana* AS 3.970 до 0,3 г/л приводило к накоплению через 5 сут двух основных продуктов – 7 $\beta$ -гидрокси-ГК (**61**, 30,0%) и 7 $\beta$ -гидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты (**64**, 25,0%), обладающих антибактериальной активностью (Qin *et al.*, 2010). Использование близкой концентрации (0,4 г/л) ГК в случае другого представителя данного рода приводило к накоплению в среде культивирования *C. elegans* TSY-0865 через 8 сут лишь 2,5% 7 $\beta$ -гидрокси-ГК (**61**) (Choudhary *et al.*, 2009).

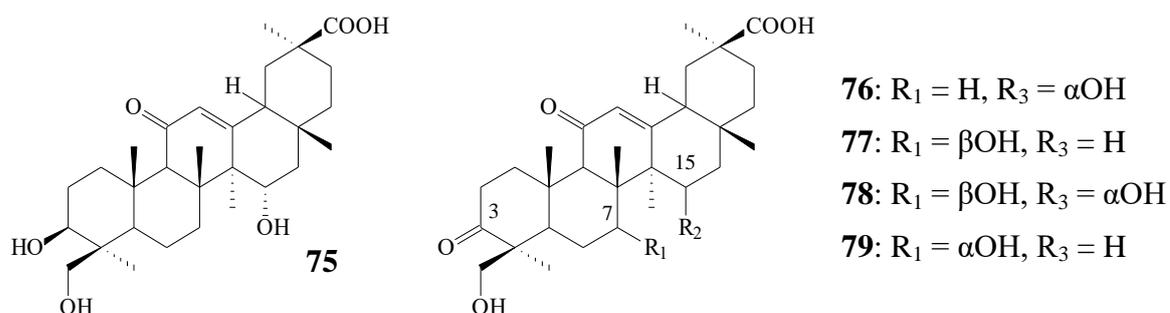


Рисунок 13 – Структурные формулы соединений **75–79**

Процессы биотрансформации УК характеризуются реакциями окисления и лактонизации. Так, зигомицеты *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500 трансформировали ~0,1 г/л УК в течение 10 сут до 7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК (**80**, 12,9%), 1 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК (**81**, 3,9%), 1 $\beta$ -гидрокси-21-оксо-УК (**82**, 12,1%), 3 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-урс-11-ен-28,13-олида (**83**, 3,4%) и 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,21 $\beta$ -тригидрокси-урс-11-ен-28,13-олида (**84**, 2,9%) (Fu *et al.*, 2013) (Рисунок 14). Сходные процессы биоконверсии ранее были продемонстрированы при использовании штамма *S. racemosum* AS 3.264 (Huang *et al.*, 2012). Показано, что производные УК с редко встречающимся фрагментом лактона проявляли незначительную ингибирующую активность в отношении вируса гепатита С (HCV) (Fu *et al.*, 2013).

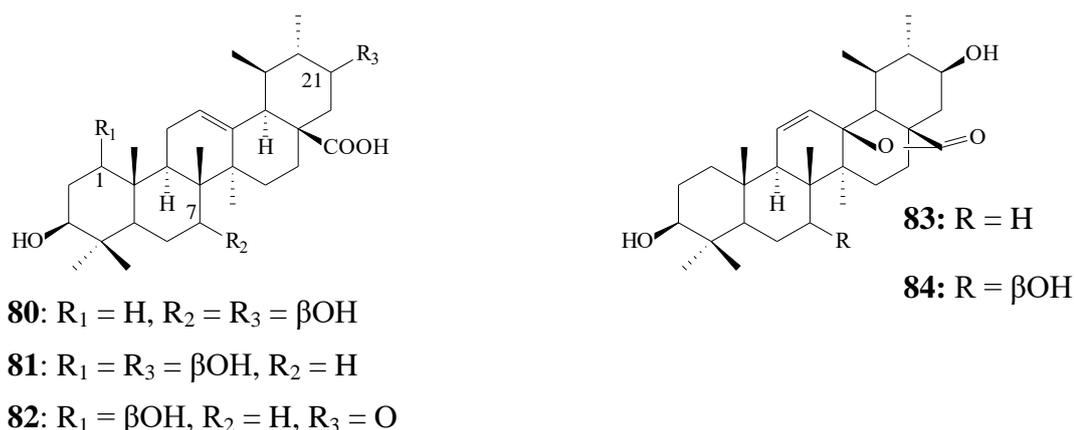


Рисунок 14 – Структурные формулы соединений **80–84**

Штамм аскомицетовых грибов *Gliocladium roseum* CGMCC 3.3657 в течение 20 сут катализировал окислительную трансформацию кольца А УК (0,1

г/л) по типу реакции Байера-Виллигера в сочетании с процессом окисления по С21 атому с образованием: 21 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-3,4-олид-3-он-28-овой кислоты (**85**, 8,0%), 21-оксо-урс-12-ен-3,4-олид-3-он-28-овой кислоты (**86**, 6,25%), 21 $\beta$ -гидрокси-3,4-секо-урсан-4(23),12-диен-3,28-диовой кислоты (**87**, 1,5%) и 21-оксо-3,4-секо-урсан-4(23),12-диен-3,28-диовой кислоты (**88**, 1,0%) (Рисунок 15). В случае производных **86** и **88**, содержащих в структуре 21-оксогруппу, была обнаружена наиболее выраженная анти-HCV активность (Fu *et al.*, 2018).

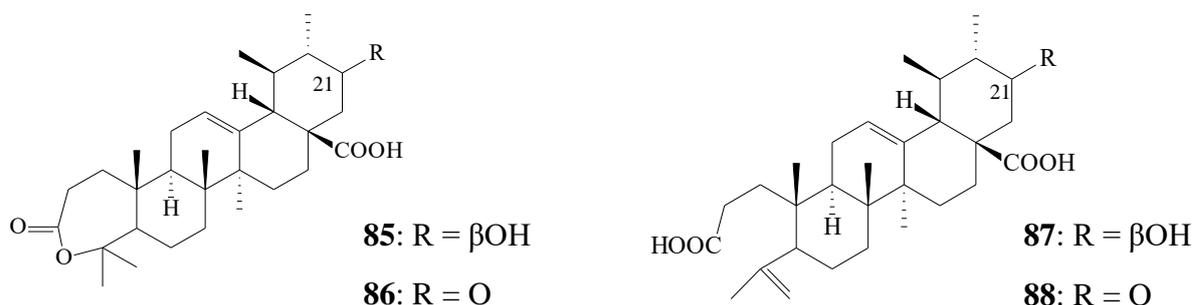


Рисунок 15 – Структурные формулы соединений **85–88**

Использование почвенной плесневой грибной культуры *Mucor spinosus* AS 3.3450 для биоконверсии УК (0,3 г/л) приводило к образованию в течение 96 ч трех метаболитов: 5,04% 7 $\beta$ -гидрокси-УК 28-этанон (**89**), 1,64% 7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК (**81**), 2,13% 21 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-28-овая кислота 3-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозид (**90**) (Рисунок 16). Показано, что соединение **89** обладало более выраженной по сравнению с УК цитотоксической активностью в отношении линий опухолевых клеток HeLa, K562 и KB (Zhang *et al.*, 2019).

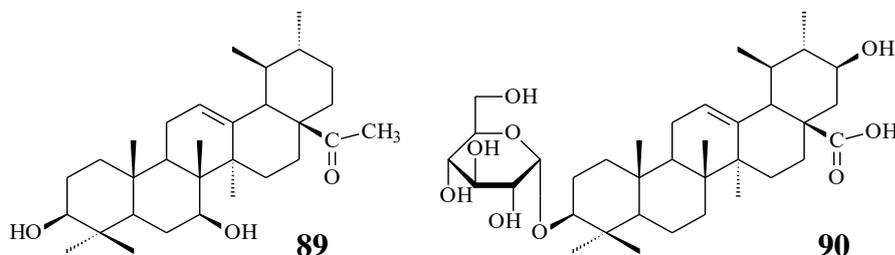


Рисунок 16 – Структурные формулы соединений **89** и **90**

### 1.4.2. Бактериальная трансформация

В литературе описаны лишь немногочисленные случаи биоконверсии пентациклических тритерпеноидов с использованием грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Nocardia* и *Streptomyces*, сопровождающиеся образованием гидроксильированных по C1, C2, C7, C11, C21, C24 или C29 производных, производных с метоксикарбонильной группой при C28, кетогруппой при C3, дополнительными карбоксильными группами при C3, C29 или C30, глюкопиранозидными группами при C3, C28 или C30, лактонной группой при C28/C13, а также производных с фрагментированным кольцом А. В экспериментах по биотрансформации исходные соединения используются, как правило, в концентрации от 0,04 до 0,3 г/л, а конечный выход производных составляет от 5,0 до 60,0%. Продолжительность экспериментов колеблется от 3 до 5 сут, лишь в случае с нокардиями продолжительность конверсии доходила до 13 сут.

Показано, что актиномицеты рода *Nocardia* способны к селективному метилированию C28 карбоксильной группы пентациклических тритерпеноидов (Zhang *et al.*, 2005). Использование покоящихся или иммобилизованных клеток *N. iowensis* (DSM 45197, NRRL 5646) в качестве биокатализаторов процесса трансформации ОК (~0,3 г/л) приводило к образованию в течение 13 сут метилового эфира ОК (**91**) в качестве основного (более 60,0%) продукта конверсии, а также небольшого ( $\leq 5,0\%$ ) количества метилового эфира 3-оксо-олеан-12-ен-28-овой кислоты (**92**) и не идентифицированного авторами метаболита **93** (Ludwig *et al.*, 2015) (Рисунок 17). Показано, что 3-оксо-ОК (**92**) проявляет высокий уровень антимеланомной (Huang *et al.*, 2006), антилейшманиозной и антитрипаносомной активности (Funari *et al.*, 2016). Несмотря на многочисленные успешные примеры повышения эффективности процесса биотрансформации за счет иммобилизации микробных клеток (Krivoguchko *et al.*, 2019), использование метода иммобилизации нокардий на альгинатных носителях привело к снижению их каталитической активности, что проявлялось в 10-кратном снижении образования соединения **91** и лишь кратковременном появлении в среде культивирования соединения **93** (Ludwig *et*

*al.*, 2015). Ранее была показана способность представителей *Nocardia* sp. к трансформации УК путем метилирования, окисления по С3 и формированию фрагмента енона в кольце А. При этом отмечалось, что процесс биотрансформации не зависел от состава использованной питательной среды, тогда как повышение температуры культивирования (с 28 до 36°C) способствовало увеличению скорости реакции в два раза (Leipold *et al.*, 2010).

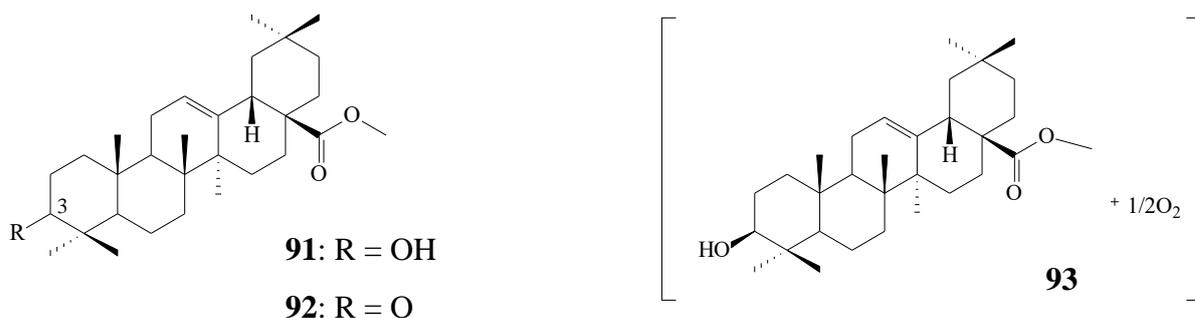


Рисунок 17 – Структурные формулы соединений **91–93**

Бактериальная культура *Streptomyces griseus* ATCC 13273 катализировала в течение 5 сут процесс гидроксирования и сайт-селективного окисления С29 метильной группы ОК (0,04 г/л) до карбоксильной с образованием 3β-гидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовой кислоты (**94**, 21,9%), 3β,24-дигидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовой кислоты (**95**, 32,7%) и 3β,21β,24-тригидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовой кислоты (**96**, 5,9%) (Рисунок 18). Показано, что гидроксирование по С21 положению способствует повышению противовоспалительной активности производных ОК (Xu *et al.*, 2017b). Ранее трансформация ОК (~0,05 г/л) с образованием производных **94** и **96** под действием данного штамма была описана Y. Zhu с соавт. (2011).

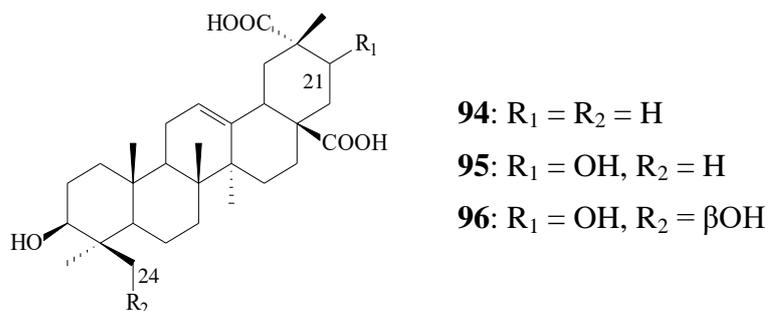


Рисунок 18 – Структурные формулы соединений **94–96**

Наряду с ОК, клетки *S. griseus* ATCC 13273 способны также трансформировать УК (0,04 г/л), катализируя на 3 сут сайт-селективное окисление С30 метильной группы до карбоксильной группы и гидроксирование по С24 с образованием 3 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**97**) и 3 $\beta$ ,24-дигидрокси-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**98**), выход которых составил более 30,0%. Использование клеток *S. griseus* ATCC 13273 для биотрансформации производных УК – 3-оксо-УК (**99**, урсеновая кислота) и 2 $\alpha$ -гидрокси-УК (**20**, корозоловая кислота) – в концентрации 0,04 г/л сопровождалось также селективным окислением по С30 и гидроксированием с образованием в первом случае смеси 3-оксо-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**100**, 24,1%) и 24-гидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**101**, 45,9%), а во втором – смеси 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -дигидрокси-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**102**, 29,0%) и 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-тригидрокси-урс-12-ен-28,30-диовой кислоты (**103**, 15,9%) (Xu *et al.*, 2017) (Рисунок 19).

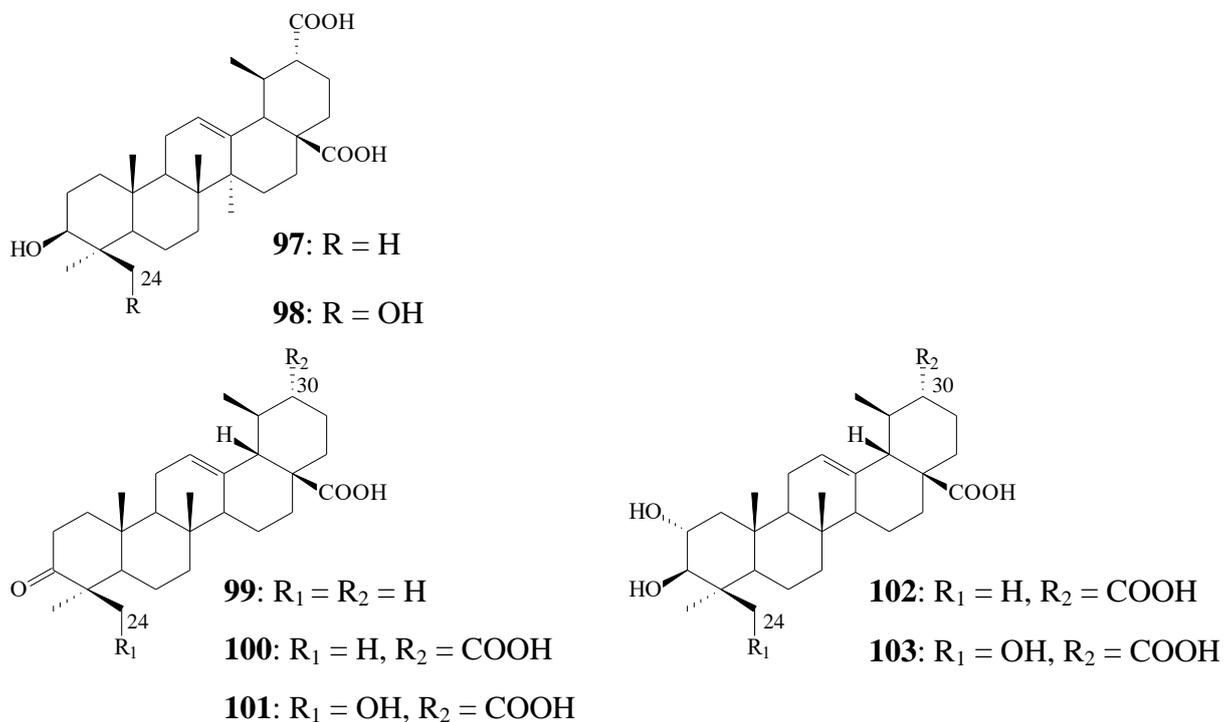


Рисунок 19 – Структурные формулы соединений **97–103**

Грамположительные бактерии *B. megaterium* CGMCC 1.1741 способны трансформировать УК (0,2 г/л) с образованием на 4 сут основного

производного 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-УК (**104**, 26,87%) и ряда минорных (5,03–13,50%) метаболитов: 3-оксо-урс-12-ен-28-овой кислоты (**99**), 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28-овой кислоты (**105**), 1 $\beta$ -гидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28,13-олида (**106**) и 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозида (**107**) (Рисунок 20). Показано, что производные **105** и **106** эффективно (IC<sub>50</sub> 1,71 и 1,24 мкмоль соответственно) ингибировали липополисахарид-индуцированное выделение NO клетками RAW 264,7 (Zhang *et al.*, 2017), а производное **99** ингибировало катепсин L-подобную rCPB2.8 протеазу *Leishmania mexicana* (De Sousa *et al.*, 2014).

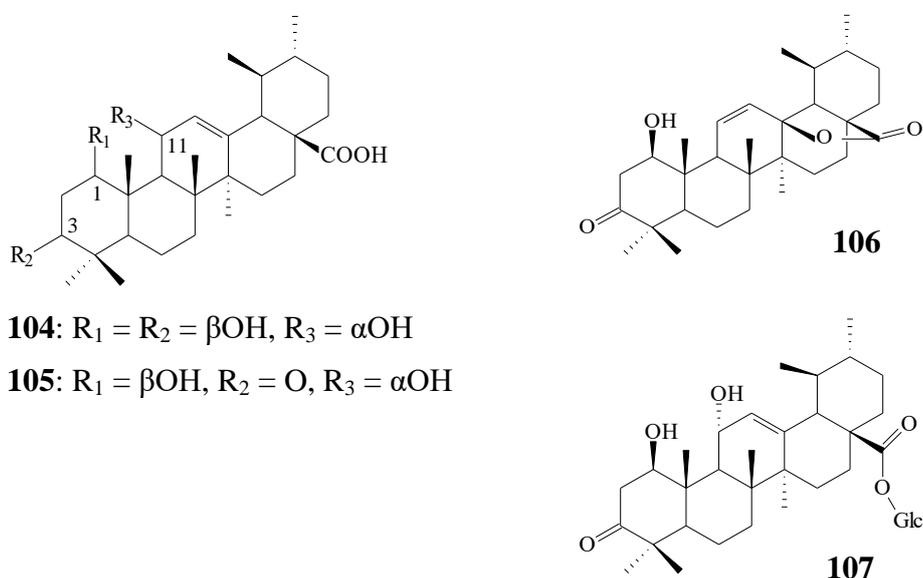
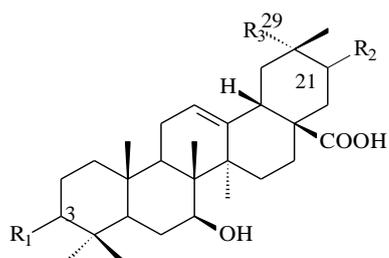


Рисунок 20 – Структурные формулы соединений **104–107**

S.H. Xu с соавт. (2020) впервые была применена техника комбинаторной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием штаммов фитопатогенных грибов *Rhizopus chinensis* CICC 40335 и бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. griseus* ATCC 13273. Первичная трансформация ОК (0,2 г/л) грибным штаммом сопровождалась образованием на 4 сут 7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК (**54**, 53,75%), синтез которой был описан ранее с использованием культур *Mucor rouxii* NRRL 1894 (Capel *et al.*, 2011) и *Circinella muscae* AS 3.2695 (Yan *et al.*, 2018). Дальнейшая биотрансформация полученного соединения (**54**) в течение 4 сут приводила к образованию 7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-олеан-12-ен-28-овой кислоты 3-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозида (**108**,

46,5%) под действием *B. subtilis* или смеси 7 $\beta$ ,21 $\beta$ ,29-тригидрокси-ОК (**109**, 26,0%) и 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,21 $\beta$ -тригидроксиолеан-12-ен-28,29-диовой кислоты (**110**, 15,0%) под действием *S. griseus* (Xu *et al.*, 2020) (Рисунок 21).

В случае биоконверсии ГК (0,2 г/л) с использованием штамма *R. chinensis* CICC 40335 протекало селективное окисление тритерпеноида с образованием на 4 сут 7 $\beta$ -гидрокси-ГК (**61**, 77,5%) (Xu *et al.*, 2020). Отметим, что процесс С7 гидроксилирования характерен для многих культур, например, *C. muscae* AS 3.2695, *Rhizopus arrhizus* AS 3.2893 (Fan *et al.*, 2019) и представителей рода *Cunninghamella* (Choudhary *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010). Последующее внесение ГК или соединения **61** в среду культивирования *B. subtilis* ATCC 6633 приводило к образованию в течение 4 сут соответствующих 30-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид-производных (**111** (27,5%) и **68** (44,0%) соответственно), которые ранее были описаны В. Fan с соавт. (2019) (Рисунок 21). Оценка нейропротекторного потенциала полученных производных ОК и ГК показала, что гликозилирование в значительной степени способствовало снижению нейропротекторной активности соединений, тогда как карбоксилирование в случае производных ОК приводило к существенному усилению нейропротекторного эффекта (Xu *et al.*, 2020).



**108:** R<sub>1</sub> = *O*- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид, R<sub>2</sub> =  $\beta$ ОН, R<sub>3</sub> = Н

**109:** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> =  $\beta$ ОН, R<sub>3</sub> = ОН

**110:** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> =  $\beta$ ОН, R<sub>3</sub> = СООН

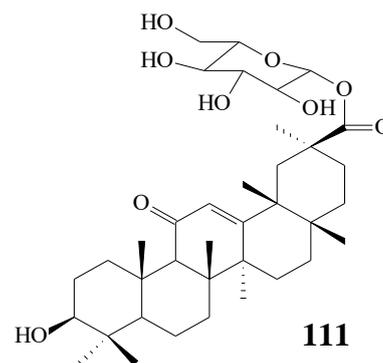


Рисунок 21 – Структурные формулы соединений **108–111**

Таблица 3 – Продукты биотрансформации ОК, ГК и УК и их биологическая активность

Микроорганизмы	Исходное соединение, концентрация	Производные, выход	Биологическая активность	Источник
<b>Грибы</b>				
<i>Rhizomucor miehei</i> СЕСТ 2749	ОК, 0,5 г/л	1 $\beta$ ,30-дигидрокси-ОК ( <b>47</b> ), 5,0%	–*	Martinez <i>et al.</i> , 2013
		7 $\beta$ ,30-дигидрокси-ОК ( <b>48</b> ), 6,0%	–	
		30-гидрокси-ОК ( <b>25</b> , кверетаровая кислота), 5,0%	Противоопухолевая	
	Метилловый эфир ОК, 0,3 г/л	Метил 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,30-тригидроксиолеан-9(11),12-диен-28-оат ( <b>49</b> ), 15,0%	–	Martinez <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichothecium roseum</i> (М 95.56)	ОК, 0,08 г/л	7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота ( <b>51</b> ), 7,5%	Противовоспалительная	Gong <i>et al.</i> , 2014
		15 $\alpha$ -гидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота ( <b>52</b> ), 6,25%	–	
<i>Circinella muscae</i> AS 3.2695	ОК, 0,02 г/л	7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота ( <b>51</b> ), 6,1%	Противовоспалительная	Yan <i>et al.</i> , 2018
		7 $\beta$ -гидрокси-ОК ( <b>53</b> ), 5,8%		
		7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК ( <b>54</b> ), 4,2%	–	
		7 $\alpha$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК ( <b>55</b> ), 3,1%	–	
		7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ОК ( <b>56</b> ), 4,9%	Противовоспалительная	
		7 $\beta$ -гидрокси-3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота ( <b>57</b> ), 3,8%	–	
		7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ОК 28- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозиловый эфир ( <b>58</b> ), 4,7%	Противовоспалительная	
		21 $\beta$ -гидрокси-ОК 28- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозиловый эфир ( <b>59</b> ), 5,1%		
		ОК 28- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозиловый эфир ( <b>60</b> ), 5,5 %		
	ГК, 0,06 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК ( <b>61</b> ), 1,5%	Противовоспалительная Противомикробная	Fan <i>et al.</i> , 2019
		15 $\alpha$ -гидрокси-ГК ( <b>62</b> ), 1,9%	Противовоспалительная	

## Продолжение таблицы 3

Микроорганизмы	Исходное соединение, концентрация	Производные, выход	Биологическая активность	Источник
		7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК (63), 1,8%	Противовоспалительная Антиоксидантная Гепатопротекторная	
		3,11-диоксо-7 $\beta$ -гидрокси-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота (64), 1,7%	Противовоспалительная Противомикробная	
		7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота (65), 2,2%	Противовоспалительная	
		7 $\beta$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид (66), 1,8%		
		7 $\beta$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -6'- <i>O</i> -ацетил-глюкопиранозид (67), 1,1%		
		15 $\alpha$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид (68), 2,5%		
		15 $\alpha$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -6'- <i>O</i> -ацетил-глюкопиранозид (69), 1,8%		
		7 $\beta$ -гидрокси-ГК 30- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид (70), 2,2%		
<i>Rhizopus arrhizus</i> AS 3.2893	ГК, 0,06 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК (61), 2,8%	Противовоспалительная Противомикробная	Fan <i>et al.</i> , 2019
		15 $\alpha$ -гидрокси-ГК (62), 2,2%	Противовоспалительная	
		7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК (63), 1,7%	Противовоспалительная Антиоксидантная Гепатопротекторная	
		3 $\beta$ -ацетокси-7 $\beta$ -гидрокси-11-оксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота (71), 1,7%	Противовоспалительная	
		7-оксо-ГК (72), 1,3%		
		7 $\alpha$ -гидрокси-ГК (73), 2,6%		
		15 $\alpha$ -гидрокси-7-оксо-ГК (74), 1,3%		

## Продолжение таблицы 3

Микроорганизмы	Исходное соединение, концентрация	Производные, выход	Биологическая активность	Ссылка
<i>Colletotrichum lini</i> AS 3.4486	ГК, 0,25 г/л	7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК ( <b>63</b> ), НД**	Противовоспалительная Антиоксидантная	He <i>et al.</i> , 2015
<i>Absidia pseudocylindrospora</i> ATCC 24169	ГК, 1,0 г/л	7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -дигидрокси-ГК ( <b>63</b> ), 18,0%	Гепатопротекторная	Maatooq <i>et al.</i> , 2010
<i>Cunninghamella blakesleana</i> CGMCC 3.970	ГК, 0,1 г/л	15 $\alpha$ ,24-дигидрокси-ГК ( <b>75</b> ), 0,11%	Противовоспалительная	Ma <i>et al.</i> , 2017
		15 $\alpha$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота ( <b>76</b> ), 0,75%	–	
		7 $\beta$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота ( <b>77</b> ), 0,16%	–	
		3,11-диоксо-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,24-тригидрокси-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота ( <b>78</b> ), 0,29%	Противовоспалительная	
		7 $\alpha$ ,24-дигидрокси-3,11-диоксо-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота ( <b>79</b> ), 1,27%		
<i>C. blakesleana</i> CGMCC 3.970	ГК, 0,3 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК ( <b>61</b> ), 30,0%	Противовоспалительная Противомикробная	Qin <i>et al.</i> , 2010
		3,11-диоксо-7 $\beta$ -гидрокси-18 $\beta$ -олеан-12-ен-30-овая кислота ( <b>64</b> ), 25,0%		
<i>C. elegans</i> TSY-0865	ГК, 0,4 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК ( <b>61</b> ), 2,5%		Choudhary <i>et al.</i> , 2009
<i>Syncephalastrum racemosum</i> GCMCC 3.2500	УК, 0,1 г/л	7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК ( <b>80</b> ), 12,9%	–	Fu <i>et al.</i> , 2013
		1 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК ( <b>81</b> ), 3,9%	–	
		1 $\beta$ -гидрокси-21-оксо-УК ( <b>82</b> ), 12,1%	–	
		3 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-урс-11-ен-28,13-олид ( <b>83</b> ), 3,4%	Противогепатитная	
		3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,21 $\beta$ -тригидрокси-урс-11-ен-28,13-олид ( <b>84</b> ), 2,9%		
<i>Gliocladium roseum</i> CGMCC 3.3657	УК, 0,1 г/л	21 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-3,4-олид-3-он-28-овая кислота ( <b>85</b> ), 8,0%	–	Fu <i>et al.</i> , 2018
		21-оксо-урс-12-ен-3,4-олид-3-он-28-овая кислота ( <b>86</b> ), 6,25%	Противогепатитная	

## Продолжение таблицы 3

Микроорганизмы	Исходное соединение, концентрация	Производные, выход	Биологическая активность	Источник
		21 $\beta$ -гидрокси-3,4-секо-урсан-4(23),12-диен-3,28-диовая кислота ( <b>87</b> ), 1,5%	–	
		21-оксо-3,4-секо-урсан-4(23),12-диен-3,28-диовая кислота ( <b>88</b> ), 1,0%	Противогепатитная	
<i>Mucor spinosus</i> AS 3.3450	УК, 0,3 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-УК 28-этанон ( <b>89</b> ), 5,04%	Противоопухолевая	Zhang <i>et al.</i> , 2019
		7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-УК ( <b>81</b> ), 1,64%	–	
		21 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-28-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-глюкопиранозид ( <b>90</b> ), 2,13%	–	
<i>Rhizopus chinensis</i> CICC 40335	ОК, 0,2 г/л	7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК ( <b>54</b> ), 53,75%	–	Xu <i>et al.</i> , 2020
	ГК, 0,2 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК ( <b>61</b> ), 77,5%	Противовоспалительная Противомикробная	
<b>Бактерии</b>				
<i>Nocardia iowensis</i> (DSM 45197, NRRL 5646)	ОК, 0,3 г/л	Метил 3 $\beta$ -гидрокси-олеан-12-ен-28-оат ( <b>91</b> ), 63,0%	Противоопухолевая	Ludwig <i>et al.</i> , 2015
		Метил 3-оксо-олеан-12-ен-28-оат ( <b>92</b> , метиловый эфир олеаноновой кислоты), 5,0%	Противоопухолевая Антипротозойная	
		Метаболит <b>93</b> с гидроксильной и метильной группами, 2,0%	–	
<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 13273	ОК, 0,04 г/л	3 $\beta$ -гидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовая кислота ( <b>94</b> ), 21,9%	–	Xu <i>et al.</i> , 2017a
		3 $\beta$ ,24-дигидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовая кислота ( <b>95</b> ), 32,7%	–	
		3 $\beta$ ,21 $\beta$ ,24-тригидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовая кислота ( <b>96</b> ), 5,9%	Противовоспалительная	
<i>S. griseus</i> ATCC 13273	УК, 0,04 г/л	3 $\beta$ -гидрокси-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>97</b> ), 30,4%	–	Xu <i>et al.</i> , 2017b
		3 $\beta$ ,24-дигидрокси-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>98</b> ), 31,6%	–	
	3-оксо-УК, 0,04 г/л	3-оксо-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>100</b> ), 24,1 %	–	
		24-гидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>101</b> ), 45,9%	–	

## Окончание таблицы 3

Микроорганизмы	Исходное соединение, концентрация	Производные, выход	Биологическая активность	Источник
	2 $\alpha$ -гидрокси-УК, 0,04 г/л	2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -дигидрокси-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>102</b> ), 29,0%	–	
		2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-тригидрокси-урс-12-ен-28,30-диовая кислота ( <b>103</b> ), 15,9%	–	
<i>Bacillus megaterium</i> CGMCC 1.1741	УК, 0,2 г/л	1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-УК ( <b>104</b> ), 26,87%	–	Zhang <i>et al.</i> , 2017
		3-оксо-урс-12-ен-28-овая кислота ( <b>99</b> ), 6,23%	Антилейшманиозная	
		1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28-овая кислота ( <b>105</b> ), 13,5%	Противовоспалительная	
		1 $\beta$ -гидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28,13-олид ( <b>106</b> ), 5,03%		
		1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-3-оксо-урс-12-ен-28- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид ( <b>107</b> ), 8,57%	–	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК, 0,2 г/л	7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-олеан-12-ен-28-овой кислоты 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид ( <b>108</b> ), 46,5%	–	Xu <i>et al.</i> , 2020
	ГК, 0,2 г/л	ГК 30- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид ( <b>111</b> ), 27,5%	–	
	7 $\beta$ -гидрокси-ГК, 0,2 г/л	7 $\beta$ -гидрокси-ГК 30- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -глюкопиранозид ( <b>68</b> ), 44,0%	–	
<i>S. griseus</i> ATCC 13273	7 $\beta$ ,21 $\beta$ -дигидрокси-ОК, 0,2 г/л	7 $\beta$ ,21 $\beta$ ,29-тригидрокси-ОК ( <b>109</b> ), 26,0%	–	
		3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,21 $\beta$ -тригидрокси-олеан-12-ен-28,29-диовая кислота ( <b>110</b> ), 15,0%	Нейропротекторная	

Примечание. \*Биологическая активность вещества не обнаружена. \*\*Значение не указано.

Таким образом, исследования по оценке возможности получения новых производных ОК, ГК и УК путем направленной биотрансформации следует отнести к актуальным и перспективным направлениям. С 2013 г. описано чуть более 20 примеров биотрансформации данных соединений с использованием культур грибов и бактерий, катализирующих чаще всего реакции гидроксирования. Реже в научной литературе встречается описание процессов более глубокого окисления тритерпеноидов, а также их гликозилирования, этерификации, ацетилирования или карбоксилирования. Процесс биокаталитического образования тритерпеновых лактонов или производных с фрагментированной С-С связью пока лишь обнаружен только в единичных случаях в отношении УК. Уровень конверсии тритерпенового субстрата с участием грибов, как правило, составляет от 2,6 до 77,5% при начальной его концентрации от 0,02 г/л до 1,0 г/л, тогда как при бактериальной трансформации конверсия достигает 27,5–70,0% при начальной концентрации 0,04–0,3 г/л терпеноидов. Анализ литературных данных показал, что метод биотрансформации пентациклических тритерпеноидов типа олеанана и урсана позволяет получать производные с антиоксидантной, противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой, противопаразитарной, противомикробной, нейропротекторной и гепатопротекторной активностью (см. Таблица 3). Данный метод получения биологически активных соединений и их интермедиатов, при условии его более активного развития как междисциплинарного инструмента, перспективен для разработки новых лекарственных агентов для борьбы со злокачественными образованиями и нейродегенеративными заболеваниями, а также антибактериальных препаратов, эффективных в отношении антибиотикоустойчивых патогенных штаммов микроорганизмов (Qin *et al.*, 2010). При сочетании подходов микробного синтеза нативных пентациклических тритерпеноидов и последующей их микробной трансформации в биодоступные соединения промышленная микробиология может обеспечить полный цикл производства ценных биологически активных веществ. Вместе с тем, необходимо отметить, что

описанные в литературе микробные катализаторы имеют значительные недостатки. Грибы, как правило, характеризуются мицелиальным типом роста, образованием спор и микотоксинов, а описанные немногочисленные бактериальные катализаторы трансформируют тритерпеноиды в крайне низкой концентрации и нередко являются представителями патогенных видов. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования процессов биологической трансформации пентациклических тритерпеноидов и поиск новых непатогенных бактериальных штаммов, использование которых позволит реализовать высокоэффективный синтез тритерпеновых производных с выраженной биологической активностью.

#### 1.5. **Актиномицеты – перспективные биотрансформаторы сложных гидрофобных соединений**

Актиномицеты представляют собой большую группу грамположительных бактерий, широко распространённых как в наземных, так и водных экосистемах. Филум *Actinomycetota* Goodfellow 2021 представлен шестью классами *Acidimicrobiia* Norris 2013, *Actinomycetes* Krassilnikov 1949, *Coriobacteriia* König 2013, *Nitriliruptoria* Ludwig *et al.* 2013, *Rubrobacteria* Suzuki 2013 и *Thermoleophilia* Suzuki and Whitman 2013 (<https://lpsn.dsmz.de/phylum/actinomycetota>). Среди них наибольший интерес представляет класс *Actinomycetes* Krassilnikov 1949, в который входят такие биотехнологически значимые семейства как *Corynebacteriaceae* Lehmann and Neumann 1907, *Dietziaceae* Rainey *et al.* 1997, *Gordoniaceae* Rainey *et al.* 1997, *Mycobacteriaceae* Chester 1897, *Nocardiaceae* Castellani and Chalmers 1919, *Streptomycetaceae* Waksman and Henrici 1943 и др. Актиномицеты обладают относительно большим геномом, часто превышающим 5 Мб, а также характеризуются высоким содержанием гуанина и цитозина. Морфология варьирует от коккоидных (*Micrococcus*) или палочковидных (*Arthrobacter*) форм до фрагментированного (*Nocardia*) или высокодифференцированного разветвлённого мицелия (*Streptomyces*). Актиномицеты существуют в свободноживущей форме, а также в качестве комменсалов или симбионтов

других организмов (Lewin *et al.*, 2016). Они играют важную роль в разложении органических веществ, таких как целлюлоза и хитин, принимая участие в круговороте органических веществ, в частности углерода (Anteneh, Franco, 2019). Известно, что представители класса *Actinomycetes* являются олиго-, нитро-, алкано-, политрофами и способны использовать в качестве источника углерода и энергии коротко- и длинноцепочечные углеводороды, галогенированные, циклические и ароматические соединения (Ившина, 1997; Bell *et al.*, 1998; de Carvalho, da Fonseca, 2005; Larkin *et al.*, 2006; de Carvalho *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Ivshina *et al.*, 2017; Krivoruchko *et al.*, 2019). При этом они способны выживать при низких концентрациях углеродного субстрата или в условиях голодания. Актиномицеты обладают способностью расти в присутствии газообразных и жидких *n*-алканов, что делает их наименее зависимыми от внешней среды. Всё вышеописанное обуславливает целесообразность использования актиномицетов в качестве высокоэффективных катализаторов трансформации сложных гидрофобных соединений.

Одним из перспективных направлений современной биотехнологии является бактериальная конверсия растительных терпеноидов с целью получения биологически активных производных. Актиномицеты способны катализировать конверсию широкого спектра терпеновых соединений от ациклических монотерпеноидов до полициклических тритерпеноидов (Гришко и соавт., 2014). Так, конверсия широко распространенного монотерпеноида лимонена клетками *Mycobacterium* sp. HXN-1500 и *R. opacus* PWD4 приводила к образованию периллилового спирта, известного своим антиканцерогенным действием (Van Beilen *et al.*, 2005), и *транс*-карвеола (Duetz *et al.*, 2001) соответственно. Позже была показана способность *R. erythropolis* MLT1 к трансформации ациклического  $\beta$ -мирцена до гераниола, применяющегося при производстве парфюмерных и пищевых продуктов, а также в качестве инсектицида (Thompson *et al.*, 2010). Недавно нами была экспериментально обоснована высокая каталитическая активность штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ

1362 в отношении моноциклического монотерпеноида (–)-изопулегола с образованием его 10-гидрокси и 10-карбокси производных, предположительно обладающих противоопухолевой активностью (Ivshina *et al.*, 2022). Способность использовать трициклические дитерпеноиды дегидроабиетиновую и изопимаровую кислоты в качестве источника углерода была показана для представителей рода *Mycobacterium* (Mohn *et al.*, 1999). Использование в качестве биокатализаторов конверсии дегидроабиетиновой кислоты клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 приводило к образованию её 5 $\alpha$ -гидроксипроизводного, перспективного в качестве противовоспалительного агента (Cheremnykh *et al.*, 2018). Тогда как конверсия данного дитерпеноида клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 сопровождалась окислением атома С-7 с последующим дигидроксилированием ароматического кольца и его метарасщеплением (Иванова и соавт., 2022). Показано, что актиномицеты рода *Nocardia* способны к селективному метилированию С28-карбоксильной группы и окислению С3-гидроксильной группы пентациклических тритерпеноидов с образованием противоопухолевых и противопаразитических агентов (Zhang *et al.*, 2005; Leipold *et al.*, 2010; Ludwig *et al.*, 2015). Представители вида *S. griseus* катализировали процесс карбоксилирования С29 или С30 метильных групп с одновременным гидроксильрованием молекул тритерпеноидов олеананового и урсанового ряда. Отдельные из полученных соединений обладали противовоспалительной и нейропротекторной активностью (Zhu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017a; Xu *et al.*, 2017b; Xu *et al.*, 2020). Выявлена способность *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 к региоселективному окислению пентациклического тритерпеноида лупанового ряда бетулина до фармакологически значимого производного – бетуллона (Grishko *et al.*, 2013; Tarasova *et al.*, 2017).

Перспективной основой для биотехнологических исследований являются специализированные центры микробиологических ресурсов. В коллекциях культур представлено большое разнообразие бактериальных штаммов, а также информация об их свойствах и возможном применении. В Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов Института

экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (официальный акроним ИЭГМ, регистрационный номер УНУ 73559, ЦКП 480868, номер во Всемирной федерации коллекций культур 285, <http://www.iegmc.ru>) поддерживается около 3000 чистых идентифицированных непатогенных штаммов актиномицетов, среди которых большое количество экстремотолерантных форм с оксигеназной активностью, штаммов-биопродуцентов и биодеструкторов (Ившина, 2012). Немицелиальный характер роста, политрофность и лабильность метаболических систем, способность к синтезу биосурфактантов, а также неисчерпаемый геномный потенциал обуславливают высокую трансформирующую активность актиномицетов в отношении различных органических соединений (Larkin *et al.*, 2006; Kuyukina, Ivshina, 2010; van Bergeijk *et al.*, 2020). Наряду с продемонстрированными выше примерами использования коллекционных штаммов актиномицетов для трансформации терпеновых соединений, показана возможность использования коллекционных культур *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 и *Gordonia terrae* ИЭГМ 136 для получения оптически активных сульфоксидов, находящих применение в химии и фармацевтике (Elkin *et al.*, 2013), а также *R. ruber* ИЭГМ 233 и *R. erythropolis* ИЭГМ 487 для биотрансформации стеролов 5 $\alpha$ -холестана и  $\beta$ -ситостерола с образованием фармакологически перспективных соединений (Ноговицина и соавт., 2010; Бажутин и соавт., 2015). В связи с этим целесообразен поиск активных трансформаторов пентациклических тритерпеноидов среди многочисленных и разнообразных штаммов актиномицетов, поддерживаемых в Коллекции ИЭГМ.

## Экспериментальная часть

### Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Рабочая коллекция

В работе использовали 148 штаммов актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; номер во Всемирной федерации коллекций культур 285, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, [www.iegmc.ru](http://www.iegmc.ru)), которые представлены следующими видами: *Brevibacterium* sp. (3 штамма), *Corynebacterium ammoniagenes* (1 штамм), *C. glutamicum* (1 штамм), *Glutamicibacter nicotinas* (1 штамм), *Gordonia terrae* (4 штамма), *Micrococcus luteus* (2 штамма), *M. lylae* (1 штамм), *Micrococcus* sp. (2 штамма), *Paeniglutamicibacter sulfureus* (1 штамм), *Rhodococcus aetherivorans* (1 штамм), *R. cercidiphylli* (1 штамм), *R. erythropolis* (32 штамма), *R. fascians* (19 штаммов), *R. jostii* (3 штамма), *R. koreensis* (1 штамм), *R. opacus* (15 штаммов), *R. qinshengii* (2 штамма), *R. rhodochrous* (27 штаммов) и *R. ruber* (31 штамм) (Таблица 4).

#### 2.2. Химические реагенты

В экспериментах использовали ОК (CAS 508-02-1) и ГК (CAS 471-53-4) высокой ( $\geq 97\%$ ) степени чистоты производства Acros Organics (США) и TCI (Бельгия) соответственно. Химические реагенты, в том числе ацетонитрил, демитилсульфоксид (ДМСО), метанол, хлороформ, этилацетат, *n*-гексан, изопропанол имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или ос.ч. (Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США). Для получения ультрачистой воды использовали Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Millipore, США).

Таблица 4 – Коллекционные штаммы актиномицетов, использованные в работе

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>Brevibacterium</i> sp.				
1–3	ИЭГМ 838, ИЭГМ 844, ИЭГМ 848	Неизвестно	Почва	Украина
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>				
4	ИЭГМ 862 <sup>†</sup>	Продуцирует 5'-инозиновую кислоту, L-изолейцин, 5'-рибозилфосфаты производных 8-азапурина	Кал младенца	Неизвестно
<i>C. glutamicum</i>				
5	ИЭГМ 861 <sup>†</sup>	Продуцирует L-глутаминовую кислоту	Почва	Неизвестно
<i>Glutamicibacter nicotinas</i>				
6	ИЭГМ 813 <sup>†</sup>	Деградирует никотин	Воздух табачных складов	Неизвестно
<i>Gordonia terrae</i>				
7	ИЭГМ 136	Использует углеводороды, катализирует окисление прохиральных сульфидов в (R)-сульфоксиды	Нефтезагрязненная почва	Украина
8	ИЭГМ 144	Использует бутан-2-ол, этанол, гексан-1-ол, нафталин, оксibenзол (фенол), пропан-1-ол, пропан-2-ол, пропан-1,2,3-триол (глицерин), ксилол, устойчив к VO <sup>2+</sup> (25,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (25,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (125,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Украина
9	ИЭГМ 148	Использует бутан-1-ол, бутан-2-ол, этанол, нафталин, пропан-1-ол, пропан-2-ол, пропан-1,2,3-триол (глицерин), ксилол, устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода реки Днепр	Полтавская область, Украина
10	ИЭГМ 163	Использует углеводороды, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, нефтегазовое месторождение	Полтавская область, Украина
<i>Micrococcus luteus</i>				
11	ИЭГМ 391 <sup>†</sup>	Продуцирует эфиры 6-аминопенициллановой кислоты и L-аспартил-L-фенилаланина	Неизвестно	Неизвестно
12	ИЭГМ 1206	Использует n-гексадекан в качестве единственного источника углерода	Почва	Новый Уренгой, полуостров Мамонтова, Ямало-Ненецкий автономный округ, Тюменская область

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>M. lylae</i>				
13	ИЭГМ 392 <sup>1</sup>	Неизвестно	Кожа человека	Неизвестно
<i>Micrococcus</i> sp.				
14	ИЭГМ 1183	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Ризосфера <i>Chenopodium</i> , дорога к солеотвалу	Соликамск, Пермский край, Россия
15	ИЭГМ 1207	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Почва	Новый Уренгой, полуостров Мамонтова, Ямало-Ненецкий автономный округ, Тюменская область
<i>Paeniglutamicibacter sulfureus</i>				
16	ИЭГМ 815 <sup>1</sup>	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода	Нефтезагрязненный рассол	Япония
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>				
17	ИЭГМ 911 <sup>1</sup>	Деградирует метил-трет-бутиловый эфир, устойчив к $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Нефтехимический шлам биоочистителя в Deer Park	Техас, США
<i>R. cercidiphylli</i>				
18	ИЭГМ 1184	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, деградирует ибупрофен, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ (5,0 мМ)	Ризосфера <i>Chenopodium</i> , дорога к солеотвалу	Соликамск, Пермский край, Россия
<i>R. erythropolis</i>				
19	ИЭГМ 7 <sup>1</sup>	Использует холестерин, нормальные и ароматические углеводороды (нафталин, оксibenзол), ароматические кислоты (4-гидроксибензоат) в качестве единственного источника углерода, деградирует диметилтерефталат, продуцирует биосурфактанты при выращивании на <i>n</i> -гексадекане, синтезирует 3-кето дельта 1,4 стероиды, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ (20,0 мМ), $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ (5,0 мМ)	Почва	Неизвестно

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
20–32	ИЭГМ 8, ИЭГМ 9, ИЭГМ 10, ИЭГМ 11, ИЭГМ 12, ИЭГМ 13, ИЭГМ 14, ИЭГМ 15, ИЭГМ 16, ИЭГМ 17, ИЭГМ 18, ИЭГМ 19, ИЭГМ 20	Используют нормальные углеводороды, алифатические спирты и ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцируют биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> ), устойчивы к Mo <sup>6+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Нефтезагрязненная почва	Украина
33	ИЭГМ 21	Использует нормальные углеводороды, алифатические спирты (этанол, октан-1-ол, пропан-1-ол, пропан-2-ол) и ароматические углеводороды (метилбензол, нафталин, оксибензол) в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Бориславское месторождение озокерита	Украина
34	ИЭГМ 22	Использует нормальные углеводороды и алифатические спирты (бутан-2-ол, этанол, октан-1-ол) в качестве единственного источника углерода, деградирует ароматические кислоты ( <i>m</i> -оксибензойная, <i>p</i> -оксибензойная), устойчив к Mo <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Пластовая вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
35	ИЭГМ 23	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, деградирует ароматические кислоты ( <i>m</i> -оксибензойная, <i>p</i> -оксибензойная), продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Mo <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Пластовая вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
36	ИЭГМ 179	Использует углеводороды и ароматические кислоты ( <i>p</i> -оксибензойную, фенилуксусную) в качестве единственного источника углерода, трансформирует β-ситостерол, устойчив к Mo <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Ni <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная вода, Камское водохранилище	Пермский край, Россия
37	ИЭГМ 191	Использует нормальные углеводороды, алифатические спирты (этанол) и ароматические углеводороды (оксибензол) в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненные донные отложения, озеро Безымянное	Тюменская область, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
38	ИЭГМ 200	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cd <sup>2+</sup> , Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода, наблюдательная гидрогеологическая скважина, Чашкинское месторождение нефти	Пермский край, Россия
39	ИЭГМ 202	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), деградирует парацетамол, проявляет лизоцимную активность, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода, родник, Ярино-Каменоложское месторождение нефти	Пермский край, Россия
40	ИЭГМ 254	Использует нормальные углеводороды, алифатические спирты (бутан-1-ол, бутан-2-ол, этанол, гексан-1-ол, пропан-1-ол), ароматические углеводороды (метилбензол) и фенилуксусную кислоту в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва	Украина
41	ИЭГМ 266	Использует углеводороды и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (20,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3+</sup> (>250,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, нефтедобывающее предприятие	Пермский край, Россия
42	ИЭГМ 275	Использует углеводороды и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), агент биоремедиации нефтезагрязненных почв, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, нефтедобывающее предприятие	Пермский край, Россия
43	ИЭГМ 344	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Муниципальные воды	Харбин, Китай
44	ИЭГМ 490	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, трансформирует β-ситостерол, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода	Тюменская область, Россия
45	ИЭГМ 499	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Минеральная вода	Сургутский район, Тюменская область, Россия
46	ИЭГМ 507	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва, территория АЗС	Пермский край, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
47	ИЭГМ 661	Использует <i>n</i> -гексадекан, бутанол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Целинная почва, Академгородок	Новосибирск, Россия
48	ИЭГМ 687	Использует алкильные, но не ароматические углеводороды, трансформирует тиоанизол, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва	Неизвестно
49	ИЭГМ 706	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва, территория нефтебазы, Полазненское месторождение нефти	Пермский край, Россия
50	ИЭГМ 766	Использует углеводороды и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, трансформирует β-ситостерол, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Cd <sup>2+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, месторождение нефти	Удмуртская республика, Россия
<i>R. fascians</i>				
51	ИЭГМ 35, ИЭГМ 36	Адгезируются к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), используют сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчивы к <i>n</i> -гексану, толуолу, Cu <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Пластовая вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
53	ИЭГМ 39	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, аккумулирует никель, устойчив к Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Пластовая вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
54	ИЭГМ 170	Аккумулирует молибден и никель, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, Cu <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (25,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Снежный покров, Полазненское месторождение нефти	Пермский край, Россия
55	ИЭГМ 173	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к бутан-1-олу, этанолу, Ni <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Pb <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная вода, Камское водохранилище	Пермский край, Россия
56	ИЭГМ 278	Адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Речная вода	Тюменская область, Россия
57	ИЭГМ 281	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
58	ИЭГМ 524, ИЭГМ 525	Используют <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчивы к Pb <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Почва, НГДУ «Краснокамскнефть»	Ножовка, Пермский край, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
60	ИЭГМ 534	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Техногенно загрязненная почва	Губаха, Пермский край, Россия
61	ИЭГМ 930, ИЭГМ 1072	Используют жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{16}$ ), бутанол и ксилол в качестве единственного источника углерода, устойчивы к $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Ризосфера <i>Artemisia vulgaris</i> , АЗС	Пермь, Россия
62	ИЭГМ 1145	Использует пропан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ (40,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ (10,0 мМ)	Ризосфера	Свердловская область, Россия
63	ИЭГМ 1158,	Используют жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{16}$ ), бутанол и ксилол в качестве единственного источника углерода, устойчивы к $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Ризосфера <i>Achillea</i> , почва, бывшая свалка	Пермь, Россия
64	ИЭГМ 1159	Использует жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{16}$ ), бутанол, ксилол, сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ (10,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ (10,0 мМ), $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ (5,0 мМ)	Ризосфера, Строгановский отвал	Свердловская область, Россия
65	ИЭГМ 1218	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Mo}^{6+}$ (10,0 мМ), $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ (5,0 мМ)	Вода, Лысьвенский бьеф	Пермский край, Россия
66	ИЭГМ 1226	Используют пропан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Ризосфера <i>Elytrigia repens</i> , месторождение нефти	Пермский край, Россия
67	ИЭГМ 1233,	<i>R. jostii</i>		
68	ИЭГМ 1235	Использует <i>n</i> -гексадекан, ксилол, глицерин, нафталин, пропанол, толуол, фенол и этанол в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, месторождение нефти	Полтавская область, Украина
69	ИЭГМ 60	Использует пропан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах ( $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{16}$ ), трансформирует тиоанизол, устойчив к $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, месторождение нефти	Украина
70	ИЭГМ 68	Продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах ( $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{16}$ ), адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к $\text{VO}^{2+}$ (12,5 мМ), $\text{VO}_4^{3-}$ (100,0 мМ), $\text{VO}^{3-}$ (>250,0 мМ)	Почва, Полазненское месторождение нефти	Пермский край, Россия
<i>R. koreensis</i>				
71	ИЭГМ 962 <sup>†</sup>	Деградирует 2,4-динитрофенол, устойчив к $\text{Pb}^{2+}$ (20,0 мМ), $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ (5,0 мМ)	Промышленные стоки	Чхонджу, Южная Корея

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>R. oracus</i>				
74	ИЭГМ 56	Трансформирует тиоанизол, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (25,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Почва, лесозащитная полоса	Херсонская область, Украина
75	ИЭГМ 57	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (25,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Украина
76	ИЭГМ 58	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, устойчив к <i>n</i> -гексану, толуолу, 1-бутанолу, этанолу, Mo <sup>6+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва, луг	Днепропетровская область, Украина
77	ИЭГМ 59	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Неизвестно	Неизвестно
78–82	ИЭГМ 246, ИЭГМ 248, ИЭГМ 264, ИЭГМ 249, ИЭГМ 262	Используют <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, трансформируют тиоанизол, адгезируются к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчивы к VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , VO <sup>3-</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Почва, производство лавсана (полиэфирный материал)	Беларусь
83–85	ИЭГМ 488, ИЭГМ 489, ИЭГМ 717	Используют <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, аккумулирует никель, устойчив к VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (12,5 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ), <i>n</i> -декану, <i>n</i> -гексану, 1-бутанолу, этанолу	Нефтезагрязненная вода, река Уньва	Пермский край, Россия
86	ИЭГМ 765	Использует <i>n</i> -декан, <i>n</i> -гексан, 1-бутанол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Пермский край, Россия
87	ИЭГМ 1157	Использует пропан, <i>n</i> -гексан, <i>n</i> -гексадекан, бензол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Ризосфера <i>Plantago</i> , бывшая свалка	Пермь, Россия
88	ИЭГМ 2226	Использует <i>n</i> -гексадекан, бензол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Пермский край, Россия
<i>R. qinshengii</i>				
89	ИЭГМ 247	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, деградирует эфиры фталевой кислоты, устойчив к Zn <sup>2+</sup> (20,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Почва, производство лавсана (полиэфирный материал)	Могилёв, Беларусь

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
90	ИЭГМ 267	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, трансформирует дитерпеноиды (дегидроабиетиновая кислота), продуцирует холестерол оксидазы, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (250,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва, нефтедобывающее предприятие	Пермский край, Россия
<i>R. rhodochrous</i>				
91	ИЭГМ 62 <sup>†</sup>	Использует холестерин, катехол, гентизат, протокатехуат и фенол в качестве единственного источника углерода, продуцирует нитрилазы, аккумулирует никель, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Pb <sup>2+</sup> (40,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> (20,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (25,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (100,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (250,0 мМ)	Неизвестно	Неизвестно
92	ИЭГМ 63	Трансформирует тиоанизол, аккумулирует ионы цезия, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
93	ИЭГМ 64	Трансформирует тиоанизол, аккумулирует молибден и никель, продуцирует холестерол оксидазу, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
94	ИЭГМ 66	Использует углеводороды, трансформирует тиоанизол, бетулин и дегидроабиетиновую кислоту, катализирует окисление прохиральных сульфидов в ( <i>S</i> )-сульфоксиды, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, этанолу, Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
95	ИЭГМ 67	Использует пропан в качестве единственного источника углерода, окисляет ряд короткоцепочечных первичных и вторичных спиртов (C2-C8) и типичных циклических и ароматических спиртов, производит эпоксиды из этена, пропена и бут-1-ена, но не из бут-2-ена, пент-1-ена или фенилпропена, трансформирует тиоанизол, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, этанолу, Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Почва	Великобритания
96	ИЭГМ 107	Использует <i>n</i> -гексадекан как единственный источник углерода, деградирует дегидроабиетиновую кислоту, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода, река Днепр	Днепропетровская область, Украина
97	ИЭГМ 608	Использует <i>n</i> -гексадекан как единственный источник углерода, деградирует дротаверина хлорид, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr <sup>6+</sup> (40,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Вода	Березники, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
98–101	ИЭГМ 609, ИЭГМ 629, ИЭГМ 632, ИЭГМ 646	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода, трансформируют тиоанизол, устойчивы к $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	Вода	Березники, Россия
102	ИЭГМ 639	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, $\text{Cr}^{6+}$ (40,0 мМ), $\text{Zn}^{2+}$ (20,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ (10,0 мМ), $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Снег, месторождение нефти	Пермский край, Россия
103	ИЭГМ 647	Продуцирует холестерол оксидазы, трансформирует тиоанизол, деградирует мелоксикам, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), аккумулирует молибден и никель, устойчив к дротаверину гидрохлориду, <i>n</i> -декану, 1-бутанолу, этанолу, $\text{Cr}^{6+}$ (5,0 мМ), $\text{VO}^{2+}$ (12,5 мМ), $\text{VO}_4^{3-}$ (50,0 мМ), $\text{VO}^{3-}$ (250,0 мМ)	Нефтезагрязненная вода, Межевское месторождение нефти	Пермский край, Россия
104	ИЭГМ 653	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, аккумулирует ионы цезия, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ (40,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ (10,0 мМ), $\text{Zn}^{2+}$ (5,0 мМ)	Неизвестно	Неизвестно
105	ИЭГМ 654	Продуцирует нитриказы, гидрогенирует нитроолефины (1-фенил-2-нитропропен до 1-фенил-2-нитропропана), трансформирует тиоанизол, устойчив к $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Почва	Неизвестно
106	ИЭГМ 655	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{16}$ ) в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, трансформирует тиоанизол, устойчив к $\text{Zn}^{2+}$ (20,0 мМ), $\text{Cr}^{6+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Почва, обогащенная пропаном и минеральными солями	Неизвестно
107	ИЭГМ 757	Использует <i>n</i> -гексадекан, бутанол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Zn}^{2+}$ (10,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Пермский край, Россия
108	ИЭГМ 760	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, окисляет алкилбензолы, устойчив к $\text{Zn}^{2+}$ (10,0 мМ), $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Почва	Неизвестно
109	ИЭГМ 1137	Использует <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан, пиридин и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ (40,0 мМ), $\text{Zn}^{2+}$ (20,0 мМ), $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Соликамск, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
110–114	ИЭГМ 1161, ИЭГМ 1162, ИЭГМ 1252, ИЭГМ 1298, ИЭГМ 1308	Используют <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчивы к Cr <sup>6+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Ризосфера <i>Atriplex</i> , бывшая свалка	Пермь, Россия
115	ИЭГМ 1360	Использует бутанол и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (40,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Ризосфера мха, почва рядом с ручьем, бухта Тихая	о. Гукера, Земля Франца Иосифа, Россия
116	ИЭГМ 1362	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, деградирует дегидроабиетиновую кислоту, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (40,0 мМ), Mo <sup>6+</sup> , Zn <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Торф, Пальтинское месторождение торфа	Пермский край, Россия
117	ИЭГМ 1363	Использует бутанол и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к Zn <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cr <sup>6+</sup> , Mo <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Нефтезагрязненная почва	Республика Удмуртия, Россия
<i>R. ruber</i>				
118	ИЭГМ 72	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), продуцирует холестерол оксидазу, трансформирует β-ситостерол, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Образец керн с глубины 110 м	Беларусь
119	ИЭГМ 73	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -гексадекане, устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (12,5 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (100,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (>250,0 мМ)	Грунтовые воды, контурная зона Масунинского месторождения	Пермский край, Россия
120	ИЭГМ 74	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), устойчив к Cr <sup>6+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Песчаный грунт ордовикского периода	Иркутская область, Россия
121	ИЭГМ 75	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Образец керн глубиной 16 м	Ульяновская область, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
122	ИЭГМ 76	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, деградирует дибутилфталат и ди(2-этилгексил)фталат, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, трансформирует тиоанизол, устойчив к $Pb^{2+}$ (10,0 мМ), $Cu^{2+}$ (5,0 мМ)	Снег, контурная зона месторождения	Пермский край, Россия
123 124	ИЭГМ 79, ИЭГМ 81	Используют пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, деградируют дибутилфталат и сложные эфиры <i>o</i> -фталевой кислоты, растут на среде с 10 мМ кадмия, аккумулируют ионы цезия, устойчивы к $Pb^{2+}$ (5,0 мМ)	Песчаная почва	Гомельская область, Беларусь
125	ИЭГМ 84	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, деградирует диметилфталат, дибутилфталат, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, трансформирует тиоанизол, аккумулирует никель, устойчив к $VO^{2+}$ (25,0 мМ), $VO_4^{3-}$ (100,0 мМ), $VO^{3+}$ (250,0 мМ)	Песчаная почва	Гомельская область, Беларусь
126	ИЭГМ 86	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $C_5-C_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, аккумулирует ионы цезия, трансформирует $\beta$ -ситостерол, устойчив к $Cr^{6+}$ , $Pb^{2+}$ (10,0 мМ), $Cu^{2+}$ (5,0 мМ)	Поверхность водохранилища, полуостров Таймыр	Красноярский край, Россия
127	ИЭГМ 87	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $C_5-C_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, устойчив к $Pb^{2+}$ (5,0 мМ)	Образец керна глубиной 39 м	Ульяновская область, Россия
128 129	ИЭГМ 90, ИЭГМ 91	Используют пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, растут на среде с 10 мМ кадмия, 10 мМ хрома, 10 мМ цинка, устойчивы к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, проявляют лизоцимную активность, трансформируют тиоанизол, устойчивы к $Mo^{6+}$ , $Pb^{2+}$ , $Zn^{2+}$	Поверхность водохранилища, полуостров Таймыр	Красноярский край, Россия
130	ИЭГМ 92	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы ( $C_5-C_{16}$ ) в качестве единственного источника углерода, устойчив к $Pb^{2+}$ (20,0 мМ), $Cu^{2+}$ (5,0 мМ)	Поверхность водохранилища, полуостров Таймыр	Красноярский край, Россия

## Продолжение таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
131	ИЭГМ 93	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, аккумулирует молибден и никель, устойчив к $\text{VO}^{2+}$ (25,0 мМ), $\text{VO}_4^{3-}$ (100,0 мМ), $\text{VO}^{3-}$ (>250,0 мМ)	Песчаная почва	Иркутская область, Россия
132	ИЭГМ 94	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_5\text{-C}_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, растет на среде с 10 мМ кадмия, устойчив к линкомицину, метициллину, полимиксину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, трансформирует тиоанизол, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ (10,0 мМ), $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Песчаная почва	Иркутская область, Россия
133	ИЭГМ 172	Использует углеводороды, сохраняет метаболическую активность (45%) при концентрации соли 123,0 г/л, трансформирует тиоанизол, $\beta$ -ситостерол, аккумулирует молибден и никель, устойчив к $\text{Cr}^{6+}$ (5,0 мМ), $\text{VO}^{2+}$ (12,5 мМ), $\text{VO}_4^{3-}$ (100,0 мМ), $\text{VO}^{3-}$ (>250,0 мМ)	Пластовая вода, месторождение нефти	Пермский край, Россия
134	ИЭГМ 219	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_5\text{-C}_7$ , $\text{C}_{11}\text{-C}_{16}$ ) в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах ( $\text{C}_{10}\text{-C}_{17}$ ), проявляет лизоцимную активность, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к 1-бутанолу, этанолу, $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Вода, река Верхний Ильич	Россия
135–137	ИЭГМ 227, ИЭГМ 232, ИЭГМ 233	Используют пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_5\text{-C}_7$ , $\text{C}_{11}\text{-C}_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, устойчивы к $\text{Pb}^{2+}$ (5,0 мМ)	Почва, Полазненское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия
138	ИЭГМ 229	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы ( $\text{C}_5\text{-C}_7$ , $\text{C}_{11}\text{-C}_{16}$ ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, устойчив к $\text{Pb}^{2+}$ (10,0 мМ), $\text{Ni}^{2+}$ (5,0 мМ)	Почва, Дороховское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия
139	ИЭГМ 231	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -гексадекане, производит гликолипидный биосурфактант с иммуномодулирующими свойствами, деградирует высокопористые керамические материалы, парацетамол, диклофенак натрия, адгезируется к жидким углеводородам, аккумулирует молибден и никель, устойчив к 1-бутанолу, этанолу, $\text{Mo}^{6+}$ (5,0 мМ), $\text{VO}^{2+}$ (25,0 мМ), $\text{VO}_4^{3-}$ (100,0 мМ), $\text{VO}^{3-}$ (>250,0 мМ)	Ручей, Ольховское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия

## Окончание таблицы 4

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
140	ИЭГМ 235	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C <sub>12</sub> -C <sub>17</sub> ), продуцирует холестерол оксидазу, деградирует парацетамол, аккумулирует молибден и никель, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ), VO <sup>2+</sup> (25,0 мМ), VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (50,0 мМ), VO <sup>3-</sup> (250,0 мМ)	Снег, Полазненское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия
141	ИЭГМ 237	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Ручей, Шеметинское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия
142	ИЭГМ 239	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ) в качестве единственного источника углерода	Песчаная порода (глубина 50 м)	Гомельская область, Беларусь
143	ИЭГМ 240	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>16</sub> ) в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr <sup>6+</sup> (10,0 мМ), Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Песчаная порода (глубина 80 м)	Гомельская область, Беларусь
144	ИЭГМ 324	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> , C <sub>11</sub> -C <sub>16</sub> ) в качестве единственного источника углерода, адгезируется к жидким углеводородам ( <i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr <sup>6+</sup> (5,0 мМ)	Дерновая почва	Свердловская область, Россия
145	ИЭГМ 333	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> , C <sub>11</sub> -C <sub>16</sub> ) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, устойчив к линкомицину, оксациллину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, накапливает гранулы полифосфата при росте на пропане, синтезирует функциональные антигены при росте на пропане, продуцирует холестерол оксидазу, аккумулирует ионы цезия, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ)	Подземные воды, контурная зона месторождения	Пермский край, Россия
146	ИЭГМ 1121	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> , C <sub>11</sub> -C <sub>16</sub> ) в качестве единственного источника углерода, устойчив к Pb <sup>2+</sup> (10,0 мМ)	Ризосфера <i>Plantago</i> , бывшая свалка	Пермь, Россия
147	ИЭГМ 1135,	Используют пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> , C <sub>11</sub> -C <sub>16</sub> ), ксилол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчивы к Pb <sup>2+</sup> (5,0 мМ)	Ризосфера <i>Poa pratensis</i> ,	Соликамск, Россия
148	ИЭГМ 1217		дорога к солеотвалу	

### 2.3. Растворимость олеаноловой и глицирретовой кислот

Растворимость определяли микрометодом серийных двукратных разведений с использованием 96-луночных круглодонных полистероловых планшетов. В лунки вносили по 100 мкл буферного раствора (рН 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0). Затем в первую лунку каждого ряда вносили 100 мкл ОК или ГК, растворенных в ДМСО (1 мг:10 мкл), и тщательно перемешивали. 100 мкл раствора из полученной смеси переносили в следующую лунку. Процедуру повторяли до образования серии двукратных разведений. Концентрация ОК или ГК в одном ряду снижалась от 500 до 4 мг/л. Растворимость определяли как концентрацию, при которой оптическая плотность ( $ОП_{630}$ ) экспериментального раствора ОК или ГК была сравнима с  $ОП_{630}$  контрольного буфера (спектрофотометр Multiscan Ascent, Thermo Electron Corporation, Финляндия).

### 2.4. Условия культивирования

Эксперименты по биотрансформации ОК и ГК проводили в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Certomat IS (Sartorius, Германия) при 28°C и 160 об/мин в минеральной среде К следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0;  $KNO_3$  – 1,0; NaCl – 1,0;  $MgSO_4$  – 0,2;  $CaCl_2$  – 0,02;  $FeCl_3$  – 0,01 с добавлением микроэлементов по Постгейту (0,1 об.%) (Postgate, 1959). ОК и ГК растворяли в ДМСО (1 мг:10 мкл) и вносили в концентрации 1,0 г/л.

### 2.5. Контроли

В качестве биотического контроля использовали инокулированную среду с дрожжевым экстрактом (0,1 г/л) без добавления ОК или ГК, в качестве абиотического контроля – неинокулированную среду с ОК или ГК. При проведении экспериментов по изучению каталитической активности суспензий нерастаущих клеток в качестве биотического контроля выступали суспензии нерастаущих клеток без тритерпеноидов, в качестве абиотического контроля – буферные растворы с тритерпеноидами.

## 2.6. Имобилизация бактериальных клеток

В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации использовали техническую ткань из нитей СВМ арт. 56313Н ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88 (ООО УкрматериалИнвест, Украина) и полипропиленовые диски PP 5-10SL (Wuhu Ecotech Trade Co, Китай). Адсорбционную ёмкость твердых носителей вычисляли по формуле 1.

$$S = (S_{\text{исх}} - S_{\text{равн}}) \times 100\% / S_{\text{исх}}, \quad (1)$$

где  $S$  – степень адсорбции, %;

$S_{\text{исх}}$  – оптическая плотность суспензии до иммобилизации, ОП<sub>600</sub>;

$S_{\text{равн}}$  – оптическая плотность суспензии после иммобилизации, ОП<sub>600</sub>.

Для иммобилизации бактериальные клетки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 48 ч, затем осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Hermle Z 200 А, Германия) и промывали фосфатно-щелочным буфером (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного (рН 7,0) буфера и доводили оптическую плотность суспензии до ОП<sub>600</sub> 1,0. В полученную суспензию вносили 10 фрагментов ткани ( $S_{\text{фрагмента}} = 1 \text{ см}^2$ ) или 200 полипропиленовых дисков ( $d_{\text{диска}} = 0,5 \text{ см}$ ) на 100 мл суспензии из расчета  $3 \times 10^7$  кл/мл. Процесс иммобилизации проводили при перемешивании 130 об/мин и температуре 28°C в течение 3 сут, незакрепленные клетки отмывали фосфатно-щелочным буфером. Изменение оптической плотности (ОП<sub>600</sub>) суспензий регистрировали с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin Elmer, США).

## 2.7. Суспензии нерастущих клеток

Родококки предварительно выращивали в МПБ в течение 48 ч. По достижению стационарной фазы роста бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин, Hermle Z 200 А, Германия) и трижды промывали эквивалентным объемом фосфатно-щелочного буфера (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 25 мл фосфатно-щелочного буфера

по Кларку-Лабсу с различным соотношением 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 0,1 М  $\text{NaOH}$  (рН 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) (Dawson *et al.*, 1986) и доводили оптическую плотность суспензий до  $\text{OP}_{600}$  2,0; 2,2; 2,4; 2,6; 2,8 (спектрофотометр Lambda EZ201, Perkin Elmer, США). Дополнительно оценивали концентрацию клеток (г/л) путем подсчета веса сухой биомассы на аналитических весах AUW120D (Shimadzu, Япония).

## 2.8. Отдельные клеточные фракции

Для определения локализации ферментов, участвующих в процессе биотрансформации ОК и ГК, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ клетки трижды отмывали, ресуспендировали в фосфатно-щелочном буфере (рН 7,0) и гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания, амплитуда 10 мкм, 45 мин). Клеточный гомогенат центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин) для получения цитоплазматических ферментов (I). Солюбилизацию мембранно-связанных ферментов проводили путём ресуспендирования осадка в 100 мл 1%-го раствора Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-щелочном буфере (рН 7,0) и перемешивания полученной суспензии на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Смесь центрифугировали и получали супернатант с экстрагируемыми мембранно-связанными ферментами (II). Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной (III), ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного буфера (рН 7,0).

## 2.9. Жизнеспособность бактериальных клеток

Для определения жизнеспособности бактериальных клеток использовали метод окрашивания йодонитротетразолием хлоридом (INT) (Kuyukina *et al.*, 2006). Для этого 100 мкл культуральной жидкости окрашивали непосредственно в 96-луночном полистероловом планшете путем внесения в лунку 50 мкл 0,2% водного раствора INT (Sigma-Aldrich, США). В результате восстановления красителя с образованием нерастворимого в воде формазана наблюдали красно-фиолетовое окрашивание, что свидетельствовало о

присутствии в образце активно респираторных бактериальных клеток. Для полного восстановления красителя образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 2 ч. Оптическую плотность формазана (ОП<sub>630</sub>) измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v. 2.6. (Thermo LabSystems, Финляндия) при длине волны 630 нм.

Для детекции живых и мертвых бактериальных клеток суспензию окрашивали двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits (Invitrogen, США). Для этого каплю (10 мкл) клеточной суспензии помещали на предметное стекло, смешивали с эквивалентным объемом красителя и оставляли в темноте на 10–15 мин. Затем окрашенный образец накрывали покровным стеклом и микроскопировали в иммерсионной системе в режиме флуоресценции на микроскопе Axio Imager M2 (Zeiss, Германия).

#### 2.10. Электрокинетический потенциал

Бактериальные клетки, предварительно выращенные в присутствии или без ОК и ГК, отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO<sub>3</sub> до ОП<sub>600</sub> 0,2 (спектрофотометр Lambda EZ201, Perkin-Elmer, США). Измерение электрокинетического ( $\zeta$ ) потенциала проводили с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Заряд бактериальных клеток определяли методом электрофоретического рассеяния света. Образец объемом 0,7 мл помещали в кювету с электродом погружного типа, на который подавали электрическое поле напряжением 4 мВ, что приводило к перемещению молекул, обладающих результирующим электрокинетическим потенциалом, к противоположно заряженному электроду со скоростью, пропорциональной напряженности поля и заряду клеток.

#### 2.11. Внутриклеточные липидные включения

Для детекции внутриклеточных липидных включений бактериальные клетки окрашивали 0,08% раствором красителя Nile Red (Nanjing Dulai

Biotechnology Co., Китай) в ДМСО, как описано ранее (Mrunalini, Girisha, 2017). Для этого суспензию клеток (1 мл) центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия). Осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли 40 мкл рабочего раствора Nile Red (конечная концентрация 0,3 мкг/мл). Полученную суспензию инкубировали при 28°C в течение 40 мин при постоянном перемешивании (160 об/мин). Клетки отделяли от реакционной среды центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Окрашенную клеточную суспензию (20 мкл) наносили на чистое предметное стекло и регистрировали флуоресценцию при использовании узкополосного светофильтра 450–500 нм на микроскопе Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия).

## 2.12. Микроскопические исследования

### *Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия*

Визуализацию и измерение размеров клеток осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия), оснащенного фотокамерой AxioCam 506 Color и флуоресцентным источником света НХР 120 V (Zeiss, Германия), в режиме фазового контраста или флуоресценции (светофильтры FS 106) с увеличением  $\times 1000$ . Объем (V) и площадь (S) клеток рассчитывали по формулам 2 и 3 (Neumann *et al.*, 2005):

$$V = r^2 \pi h; \quad (2)$$

$$S = 2r^2 \pi + \pi r h, \quad (3)$$

где  $r$  –  $\frac{1}{2}$  ширины клетки, мкм;

$\pi$  – 3,14;

$h$  – длина клетки, мкм.

*Атомно-силовая (АСМ) и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)*

Для получения изображений бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D (Asylum Research, США), каплю

(15–20 мкл) клеточной суспензии помещали на покровное стекло, смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и подсушивали при комнатной температуре в темноте в течение 10–15 мин. Препарат промывали деионизированной водой и сканировали с помощью КЛСМ. Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя Live/Dead<sup>®</sup>, применяли аргоновый лазер ( $\lambda=488$  нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ( $\lambda=543$  нм) с 560/660-нм барьерным фильтром, соответственно. Изображения клеток (размер 0,12×0,12 мм, разрешение 1600×1600 пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония). КЛСМ-изображение импортировали в программное обеспечение АСМ Igor Pro 6/22А (Wave Metrics, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера АС240ТS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0,5–4,4 Н/м.

*Сканирующая (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)*

Культуры, выращенные в течение 72 ч на плотных средах без или в присутствии ОК или ГК, фиксировали в 2,5% глутаральдегиде (вес/об.) в 0,1 М буфере какодилата натрия (рН 7,2) в течение 2,5 часов и затем постфиксировали в 1% (вес/об.) четырехокиси осмия в том же буфере. Зафиксированный материал обезвоживали серией растворов этанола, в том числе абсолютным этанолом, насыщенным ацетатом уранила и заливали в аралдит. Тонкие срезы готовили на ультратоме 8800 Ultrotome III (LKB-Produkter, Швеция) и окрашивали цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония). Целые клетки просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

### 2.13. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов

Суспензии клеток в дистиллированной воде (без фиксатора) наносили на покрытые формваром и армированные углеродом медные сетки и сушили на воздухе. ПЭМ с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС) и картированием элементов выполняли на микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенный системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания), работающей при ускоряющем напряжении 80 кэВ (угол наклона 15°). ЭДС-спектры и элементные карты были получены с использованием программного обеспечения AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

### 2.14. Респираторная активность

Оценку респираторной активности осуществляли с помощью высокочувствительного 10-канального респирометра непрямого цикла MicroOxymax<sup>®</sup> (Columbus Instruments, США). Эксперименты проводили в колбах Micro-Охумах с объемом 300 мл, содержащих 100 мл среды, в условиях постоянного перемешивания (300 об/мин, 28°C) с помощью многоместной магнитной мешалке RT 10 (Power IKAMAG, Германия). Количество (мкл) и скорость (мкл/час) поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа регистрировались автоматически каждые 30 минут.

### 2.15. Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование штаммов-биотрансформаторов проводили на базе биотехнологической компании CeGaT GmbH (Тюбинген, Германия) с использованием секвенатора Illumina NovaSeq (Illumina, США) и метода сборки генома SPAdes v.3.14.1. Полные геномы штаммов *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 внесены в базу данных NCBI под номерами JAJNCN000000000.1 и JAJNCO000000000.1 соответственно

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JAJNCN000000000>;  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JAJNCO000000000>).

### 2.16. Биоинформатический анализ

Поиск функциональных генов, предположительно участвующих в процессе биотрансформации тритерпеноидов, проводили в международной базе данных NCBI на основе автоматически аннотированных полных геномов штаммов-биотрансформаторов. Подбор пар праймеров и сравнение последовательностей целевых генов проводили с использованием сервисов Primer-BLAST и BLASTN, доступных на сайте NCBI, соответственно. Поиск биосинтетических генных кластеров в геномах штаммов-биотрансформаторов методом геномного майнинга осуществляли с использованием онлайн-сервисов AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2021) и PRISM (<https://prism.adapsyn.com/>) (Skinnider *et al.*, 2020). Анализ аминокислотных последовательностей и построение метаболических путей проводили с использованием базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>) и сервисов GhostKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016) и RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, <https://rast.nmpdr.org/>) (Brettin *et al.*, 2015).

### 2.17. Молекулярно-генетический анализ

Выделение ДНК проводили с использованием биомассы, полученной в результате предварительного культивирования культур в МПБ в течение 2 сут, согласно Протоколу набора для выделения геномной ДНК ExtractDNA Blood (Евроген, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора QuDye dsDNA BR (Lumiprobe, Россия) и спектрофотометра NanoPhotometer N50 (Implen, США) соответственно. Полученную ДНК использовали для ПЦР в реальном времени с готовой смесью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и праймерами, подобранными в результате биоинформатического анализа, на амплификаторе Real-time CFX

Connect (Bio-Rad, США). Положительным контролем служили видо-специфические праймеры на основе гена 16S рРНК к *Rhodococcus rhodochrous*.

Протокол ПЦР включал следующие стадии и условия:

Стадия 1	95,0°C; 3 мин	} 34 цикла
Стадия 2	95,0°C; 30 сек	
Стадия 3	Градиент 55,0–65,0°C; 30 сек	
Стадия 4	72,0°C; 1:30 мин	
Стадия 5	Кривая плавления от 65,0 до 95,0°C, шаг 0,5°C; 5 сек	
Стадия 6	72,0°C; 10 мин	

Присутствие и размеры продуктов амплификации в реакционной смеси после ПЦР определяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (1,5% агароза в TBE-буфере) с использованием системы гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Электрофоретическое разделение проводили при напряжении 70В в течение 40 мин. В качестве красителя нуклеиновых кислот использовали GelRed (Диаэм, Москва). Продукты ПЦР (5 мкл) вносили в агарозный гель в буфере для внесения 4X Gel Loading Dye, Blue (0,5 мкл) (Евроген, Россия). Для определения размера продуктов ПЦР в гель вносили маркер длин ДНК от 700 до 50 п.н. (Евроген, Россия).

### **2.18. Количественный и качественный анализ олеаноловой и глицирретовой кислот и продуктов их биотрансформации**

Для экстракции остаточных ОК, ГК и продуктов их биотрансформации постферментационную среду подкисляли 10% водным раствором HCl до pH 3,0–4,0 и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1% водным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и дистиллированной водой (до pH 7,0). Полученный этилацетатный экстракт обезвоживали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Качественную оценку этилацетатных экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-гексан:этилацетат (1:1 или 4:1) на

пластинках Alugram<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel GmbH&Co, Германия). Детекцию соединений проводили путем облучения пластинки ультрафиолетом с длиной волны 254 нм или обработки пластинки 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин.

Качественный анализ экстрактов и оценку динамики образования продукта трансформации ГК проводили методом газовой хромато-масс спектрометрии (ГХ-МС) на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890B/5977B (Agilent Technology, США) на колонке HP-5ms UI (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм) в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ), газ-носитель – гелий. Температура испарителя составляла 300°C, температура термостата колонки повышалась со 100°C до 300°C с шагом 30°C/мин, выдерживание составляло 18,5–23,0 мин. Пробу вводили в объеме 0,1–0,2 мкл с делением потока 1:9–1:39. Сканирование проводили в диапазоне молекулярных масс  $m/z$  35–535 а.е.м со скоростью 1,5 скана/с. Предварительно пробы обрабатывали (триметилсилил) diazometаном (Sigma-Aldrich, США). Полученные масс-спектры сравнивали с известными масс-спектрами из библиотеки NIST08 MS Library.

Динамику образования продуктов трансформации ОК оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазовой колонке Kromasil 100-5-C18 (C18, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å, 250 мм × 4,6 мм, Eka Chemicals AB, Швеция). В качестве элюента выступала смесь ацетонитрил:деионизированная вода в процентном соотношении 80:20. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл. Пробы предварительно растворяли в изопропанолe или ацетонитриле (ос.ч., Криохром, Россия). Расчет концентраций ОК и продуктов ее конверсии в процессе биотрансформации проводили на основании уравнения 4, составленного по калибровочной кривой зависимости концентрации аналитического метчика ОК от площади пиков.

$$y = 7E-06x - 1,2389, \quad (4)$$

где  $x$  – площадь пика, mAU;

$y$  – концентрация, %.

## 2.19. Препаративное выделение и идентификация продуктов биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот

Для препаративного выделения продуктов биотрансформации ОК и ГК смесь этилацетатных экстрактов, полученных в результате процессов биотрансформации, обезвоживали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли путем отгонки на роторном испарителе (Heildolh, Германия). Полученные смеси разделяли с помощью колоночной или флэш-хроматографии. Первичную идентификацию продуктов биотрансформации проводили путем сравнения масс-спектров полученных соединений с масс-спектрами известных соединений из библиотеки NIST08 Mass Spectral Library. Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектров исследуемого вещества с библиотечными с коэффициентом подобия, превышающим 90%. Дальнейшую идентификацию соединений проводили методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и рентгеноструктурного анализа (РСА). Спектры  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и DEPT ЯМР регистрировали с использованием ЯМР-спектрофотометра Bruker AVANCE II (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при частоте 400 и 100 МГц. В качестве растворителей использовали  $\text{CDCl}_3$  или ДМСО- $d_6$ . Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 (Perkin Elmer, США) при длине волны 589 нм для растворов в  $\text{CHCl}_3$ . Точку плавления регистрировали с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) со скоростью нагрева  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ .

Экстракт, полученный в процессе биотрансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, разделяли с помощью флэш-хроматографа (Buchi, Швейцария) и картриджа Sepacore Silica 40g (26,7 мм×127 мм) при соотношении вещества и сорбента 1:30 (по весу). При использовании в качестве

элюента 100% хлороформа последовательно получали соединение **112** и остаточную ОК. Перекристаллизацию соединения **112** проводили в системе изопропанол:хлороформ (3:1, об./об.).

3-Оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота (**112**). Белый порошок,  $T_{\text{плав}}$  202,6°C (лит.: 167–169°C (Maldonado *et al.*, 2015)),  $R_f$  0,45 (н-гексан:этилацетат 1:1, об./об.),  $[\alpha]_D^{20} = +38,8^\circ$  ( $c$  0,5,  $\text{CHCl}_3$ ) (лит.:  $[\alpha]_D^{25} = +73,6^\circ$  ( $c$  0,26,  $\text{CHCl}_3$ ) (Ma *et al.*, 2002);  $[\alpha]_D = +93,5^\circ$  ( $c$  0,23,  $\text{CHCl}_3$ ) (Maldonado *et al.*, 2015)).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, J/Гц): 5,30 (1H, H-12); 2,85 (1 H, dd,  $J = 4,0, 16,0$  Гц), 2,53 и 2,35 (2 H, 2m), 1,14; 1,08; 1,04; 1,02; 0,93; 0,90; 0,81 (каждый 3H, 7s, 7 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 217,47 (C-3); 183,19 (C-28); 143,64 (C-13); 122,42 (C-12); 55,36; 47,40; 46,91; 46,58; 45,86; 41,78; 41,12; 39,32; 39,12; 36,81; 34,11; 33,83; 33,01; 32,42; 32,21; 30,65; 27,71; 26,48; 25,80; 23,54; 23,50; 22,96; 21,42; 19,57; 16,99; 14,99.

Экстракты, полученные в процессе биотрансформации ГК штаммами *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757, также разделяли с помощью флэш-хроматографа (Buchi, Швейцария) и картриджа Sepacore Silica 40g (26,7 мм×127 мм) при соотношении вещества и сорбента 1:30 (по весу). При использовании в качестве элюента смеси хлороформ:изопропанол с градиентом концентраций от 100:0 до 99:1 (об./об.) последовательно получали соединение **113** и остаточную ГК. Перекристаллизацию соединения **113** проводили в системе изопропанол:хлороформ (3:1, об./об.).

3,11-Диоксо-олеан-12-ен-30-овая кислота (**113**). Белый порошок,  $T_{\text{плав}}$  274,4°C (лит.: 311–313°C (Beseda *et al.*, 2010)),  $R_f$  0,45 (н-гексан:этилацетат 4:1, об./об.),  $[\alpha]_D^{20} = +218,2^\circ$  ( $c$  0,5,  $\text{CHCl}_3$ ) (лит.:  $[\alpha]_D^{20} = +184,5$  ( $c$  0,4,  $\text{CHCl}_3$ ) (Beseda *et al.*, 2010)).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, J/Гц): 5,74 (1H, H-12); 2,96 (1H, m); 2,63 (1H, m); 2,44 (1H, s, H-9); 2,35 (1H, m); 2,22 (1H, dd,  $J = 4,0, 16,0$  Гц); 1,37; 1,27; 1,22; 1,17; 1,10; 1,06; 0,85 (каждый 3H, 7s, 7 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 217,07 (C-3); 199,56 (C-11); 181,21 (C-30); 169,66 (C-13); 128,48 (C-12); 61,08; 55,52; 48,29; 47,76; 45,30; 43,79;

43,37; 41,01; 39,76; 37,73; 36,75; 34,21; 32,19; 31,89; 30,95; 28,57; 28,39; 26,58; 26,44 (2С); 23,34; 21,43; 18,83; 18,56; 15,61.

Экстракт, полученный в процессе биотрансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, разделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле марки «Macherey-Nagel» (60–200 мкм, Германия). При использовании в качестве элюента смеси *n*-гексан:этилацетат с градиентом концентраций от 9:1 до 4:1 (об./об.) последовательно выделяли остаточную ОК и соединение **114**. Перекристаллизацию соединения **114** проводили в системе этилацетат:хлороформ (2:1, об./об.).

3β,5α,22α-Тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовая (5α,22α-дигидроксигипсогеновая) кислота (**114**). Желтые игловидные кристаллы,  $T_{\text{плав}}$  201°C (этилацетат:хлороформ 1:0,1, об./об.),  $R_f$  0,01 (*n*-гексан:этилацетат 1:1, об./об.),  $[\alpha]_D^{24} = +20,8^\circ$  (*c* 0,5, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, ppm, J/Гц): 5,17 (1H, m, H-12); 4,35 (1H, m, H-22); 3,79 (1H, dd, J = 11,2; 5,5 Гц, H-3); 1,20; 1,15; 1,02; 0,96; 0,92; 0,75 (каждый 3H, 6s, 6CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>, δ, ppm): 179,92 (s, C-28); 177,16 (s, C-23); 143,53 (s, C-13); 121,46 (d, C-12); 95,39; 76,50 (s, C-5); 70,21 (d, C-3); 69,70 (d, C-22); 56,43; 51,45; 44,88; 42,55; 42,40; 42,11; 38,12; 38,01; 32,91; 31,43; 30,87; 26,46 (3C); 26,00; 25,74; 24,65; 23,11; 17,56; 16,89; 15,30; 12,98.

РСА соединения **114** выполняли на монокристалльном дифрактометре Xcalibur Ruby (Agilent Technologies, Великобритания) с CCD-детектором по стандартной методике (MoKα-излучение, 295(2) К, ω-сканирование с шагом 1°). Поглощение учтено эмпирически с использованием алгоритма SCALE3 ABSPACK (CrysAlisPro, 2014). Сингония кристалла (дигидрат 3,5,22-тригидроксиолеан-12-ене-23,28-диовой кислоты, C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>·2(H<sub>2</sub>O), *M* 554,70) моноклинная, пространственная группа *I*2, *a* 14,588(5) Å, *b* 7,0874(19) Å, *c* 31,788(16) Å, β 102,25(4)°, *V* 3212(2) Å<sup>3</sup>, *Z* 4,  $d_{\text{выч}}$  1,147 г/см<sup>3</sup>, μ 0,083 мм<sup>-1</sup>. Структура расшифрована с помощью программы SHELXS (Sheldrick, 2008) и уточнена полноматричным МНК по  $F^2$  в анизотропном приближении для всех неводородных атомов с использованием программы SHELXL (Sheldrick, 2015) с

графическим интерфейсом OLEX2 (Dolomanov *et al.*, 2009). При уточнении атомов водорода использована модель “наездника” (riding model). Атомы водорода молекул воды не локализованы, но учтены в брутто-формуле. Разупорядоченная молекула неидентифицированного растворителя удалена с использованием процедуры SQUEEZE в программе PLATON (Spek, 2015) и не учтена в брутто-формуле. Окончательные параметры уточнения:  $R_1$  0,0890 [для 2140 отражений с  $I > 2\sigma(I)$ ],  $wR_2$  0,2809 (для всех 6600 независимых отражений,  $R_{\text{int}}$  0,0694),  $S$  0,950. Результаты PCA зарегистрированы в Кембриджском центре кристаллографических данных под номером CCDC 2211937 ([www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)).

Кристаллографические данные  $3\beta,5\alpha,22\alpha$ -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой ( $5\alpha,22\alpha$ -дигидроксигипсогеновой) кислоты (**114**):  $C_{30}H_{46}O_7$ ,  $M = 518,68$ , моноклинная, пространственная группа  $P2_1$ , при 296K:  $a = 14,588(5)$ ,  $b = 7,0874(19)$ ,  $c = 31,788(16)$  Å,  $\beta = 102,25(4)^\circ$ ,  $V = 519,03(4)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $d_{\text{calc}} = 1,179$  г/см<sup>3</sup>,  $\mu = 0,083$  мм<sup>-1</sup>, всего 15008 ( $\theta_{\text{max}} = 27,61^\circ$ ), 2411 уникальных ( $R_{\text{int}} = 0,0409$ ), 2248 [ $I > 2\sigma(I)$ ], 127 параметров. GooF = 1,015,  $R_1 = 0,0332$ ,  $wR_2 = 0,0870$  [ $I > 2\sigma(I)$ ],  $R_1 = 0,0365$ ,  $wR_2 = 0,0906$  (все данные), макс./мин. разн. пик 0,18/-0,12 e/Å<sup>3</sup>.

## 2.20. *In silico* анализ продуктов биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот

Экотоксичность и растворимость ОК, ГК и их производных рассчитывали с помощью программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Оценку потенциальной острой и хронической токсичности в отношении водных организмов прогнозировали на основании доступных данных по токсическим эффектам органических соединений различных химических классов с использованием компьютеризированного анализа структурно-функциональной взаимосвязи в молекулах.

Оценку предполагаемой биологической активности полученных производных ОК и ГК прогнозировали на основе их структурных формул с

использованием онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Результат исследования биопотенциала веществ представлял собой список прогнозируемых видов биологической активности с оценкой вероятности обнаружения ( $P_a$ ) и не обнаружения ( $P_i$ ) последней. Наибольшая вероятность проявления биологической активности принималась за единицу.

### 2.21. Фитотоксичность олеаноловой и глицирретовой кислот и продуктов их биотрансформации

Определение фитотоксичности в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В экспериментах использовали семена, всхожесть которых составляла 95%. Семена проращивали в течение 3 сут в стерильных чашках Петри с фильтровальной бумагой, пропитанной дистиллированной водой (5 мл). Затем проросшие семена обрабатывали супернатантами, полученными в результате 5 сут процесса биотрансформации ОК и ГК. Степень фитотоксичности определяли по истечении 7 сут по величине эффекта торможения роста корневой системы по формуле 5:

$$E_T = (L_K - L_{OP}) / L_K \times 100\% \quad (5),$$

где  $E_T$  – эффект торможения, %;

$L_{OP}$  – средняя длина корней в опыте, мм;

$L_K$  – средняя длина корней в контроле, мм.

Фитотоксическое действие считалось доказанным, если фитoeffект  $E_T$  составлял 20% и более.

### 2.22. Антибактериальная активность

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ОК, ГК и продуктов их биотрансформации в отношении бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 определяли методом двукратных серийных разведений (Wiegand *et al.*, 2008) с использованием 96-луночных

полистероловых планшетов. Растворенные в ДМСО (1 мг:10 мкл) ОК, ГК и продукты их биотрансформации вносили в лунки, содержащие МПБ, в начальной концентрации 50 мг/мл с последующим серийным двукратным разведением. В лунки добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии ( $2 \times 10^6$  кл/мл). Планшеты выдерживали при оптимальной для тест-культур температуре 28°C (*M. luteus* NCIMB 196) или 37°C (*B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) в течение 24 ч. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали путем окрашивания INT. Образование нерастворимого формазана и соответствующего пурпурного окрашивания свидетельствовало о наличии в лунках активно респираторных клеток. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

### 2.23. Цитотоксическая активность

Линии раковых клеток молочной железы человека MCF-7, MDA-MB-453, HBL-100 и его доксорубицин-устойчивый вариант HBL100/Dox предварительно культивировали в среде ДМЕМ (в случае MCF-7 и MDA-MB-453) или RPMI-1640 (в случае HBL-100 и HBL100/Dox) (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 2 мМ L-глутамин (Панэко, Россия) и 1% раствора пенициллина/стрептомицина (50 Ед/мл; 50 мкг/мл) (Панэко, Россия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора (Thermo Fisher Scientific, США).

Цитотоксическую активность соединения **114** определяли с помощью классического МТТ-теста (Mosmann, 1983). Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью  $1 \times 10^4$  клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Соединение **114** растворяли в ДМСО (Панэко, Россия) до концентрации  $1 \times 10^{-2}$  М и дополнительно разводили в среде ДМЕМ, затем добавляли к клеткам в диапазоне концентраций от 0,3125 до 100 мкМ. После 72 ч инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в течение 3 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую

лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 544 нм с помощью планшетного спектрофотометра FLUOstar Optima (BMG Labtech, Германия). Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток ( $IC_{50}$ ), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

#### **2.24. Статистическая обработка результатов**

Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 13 (StatSoft, 2018). При использовании степени достоверности различий средних арифметических использовали t-критерий Стьюдента.

### Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ ОЛЕАНОЛОВУЮ И ГЛИЦИРРЕТОВУЮ КИСЛОТЫ

В результате скрининга 148 коллекционных штаммов актиномицетов, показано, что лишь отдельные штаммы, относящиеся к видам *R. jostii* (1 штамм), *R. opacus* (4 штамма), *R. rhodochrous* (5 штаммов) и *R. ruber* (2 штамма), способны использовать 1,0 г/л ОК или ГК в качестве единственного источника углерода и энергии. Наибольшую целевую трансформирующую активность в отношении обоих тритерпеноидов проявляли штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757. Данные штаммы были отобраны для дальнейших исследований.

По нашим данным, процесс биотрансформации ГК обоими штаммами сопровождался образованием на 5 сут продукта с  $R_f$  0,45 (соединение **113**, Рисунок 22Б,В). Тогда как биоконверсия ОК штаммами *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 значительно отличалась. В первом случае в течение 5 сут наблюдалась частичная трансформация ОК с образованием продукта с  $R_f$  0,45 (соединение **112**, Рисунок 23Б). Во втором случае – полная трансформация ОК с образованием продукта с  $R_f$  0,01 (соединение **114**, Рисунок 23В).

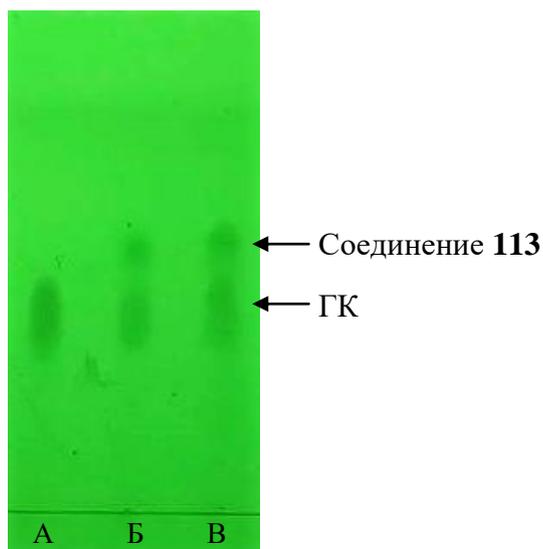


Рисунок 22 – ТСХ ГК (А) и продуктов ее биотрансформации штаммами *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (Б) и ИЭГМ 757 (В). Данные приведены на 5 сут процесса биотрансформации

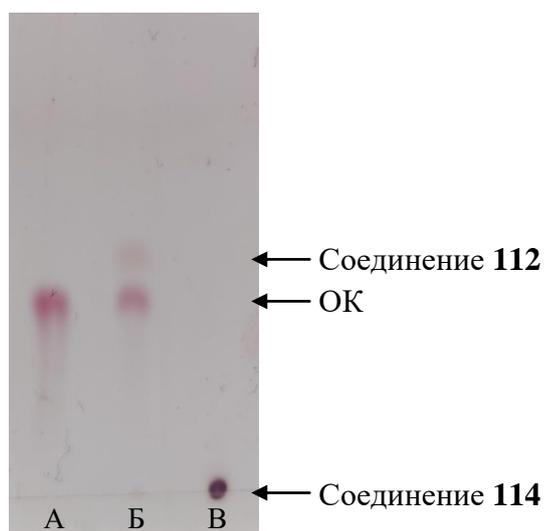


Рисунок 23 – ТСХ ОК (А) и продуктов ее биотрансформации штаммами *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (Б) и ИЭГМ 757 (В). Данные приведены на 5 сут процесса биотрансформации

Изучение динамики процесса биотрансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 методом ВЭЖХ показало, что максимум каталитической активности родококков приходился на 2 сут и сопровождался образованием 13,1% соединения **112**, концентрация которого незначительно возрастала (до 17,0%) к концу эксперимента. При этом стоит отметить, что показатель жизнеспособности клеток в присутствии ОК был в 3,7–4,2 раза ниже (ОП<sub>630</sub> 0,13–0,14), чем в биотическом контроле (ОП<sub>630</sub> 0,50–0,57), что свидетельствует о токсическом эффекте ОК в отношении клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (Рисунок 224). Проявление трансформирующей активности клеток при отсутствии явного прироста клеточной биомассы в данном случае может быть связано с образованием в популяции так называемых жизнеспособных, но некультивируемых клеток (*variable but nonculturable*, VBNC), особенностью которых является прекращение деления при сохранении метаболической активности (Su *et al.*, 2015).

Трансформация ГК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 также характеризовалась максимумом каталитической активности клеток на 2 сут с образованием около 50% окисленного производного (**113**). При этом наблюдали

значительный прирост биомассы, количество которой на протяжении всего эксперимента было в 4 раза выше, чем в биотическом контроле (Рисунок 25).

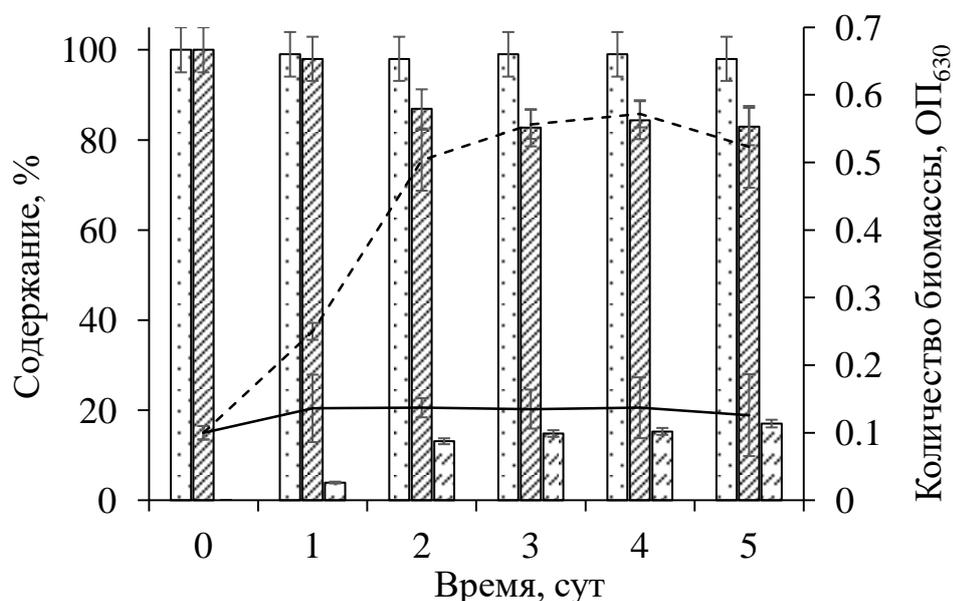


Рисунок 24 – Динамика трансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360: ОК (▨), соединение **112** (▤), абиотический контроль (▥). Количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток в присутствии (—) и без (---) ОК. Приведены данные ВЭЖХ посткультуральных экстрактов

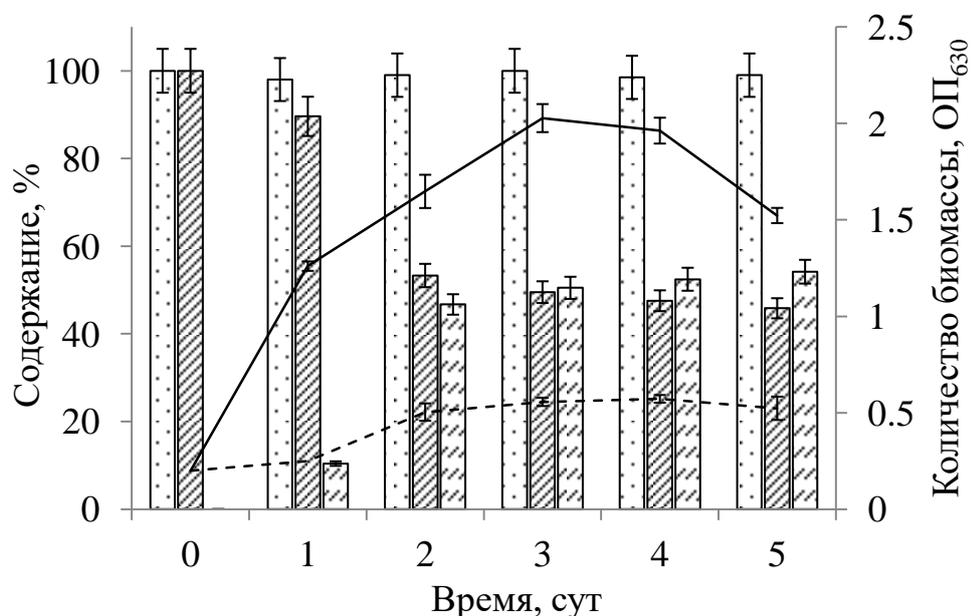


Рисунок 25 – Динамика трансформации ГК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360: ГК (▨), соединение **113** (▤), абиотический контроль (▥). Количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток в присутствии (—) и без (---) ГК. Приведены данные ГХ-МС посткультуральных экстрактов

Результаты исследования динамики убыли ОК и прироста клеточной биомассы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 показали, что максимум каталитической активности родококков приходился на 1 сут и сопровождался практически полной (более 98%) деструкцией ОК, образованием соединения **114** и значительным увеличением количества биомассы (от ОП<sub>630</sub> 0,1 до ОП<sub>630</sub> 1,3) (Рисунок 26). На 2 сут содержание производного сокращалось (с 28 до 12%) и практически не изменялось до окончания эксперимента. Пятые сутки характеризовались сокращением количества жизнеспособных клеток (до ОП<sub>630</sub> 0,9), при этом остаточная ОК в посткультуральных экстрактах не детектировалась.

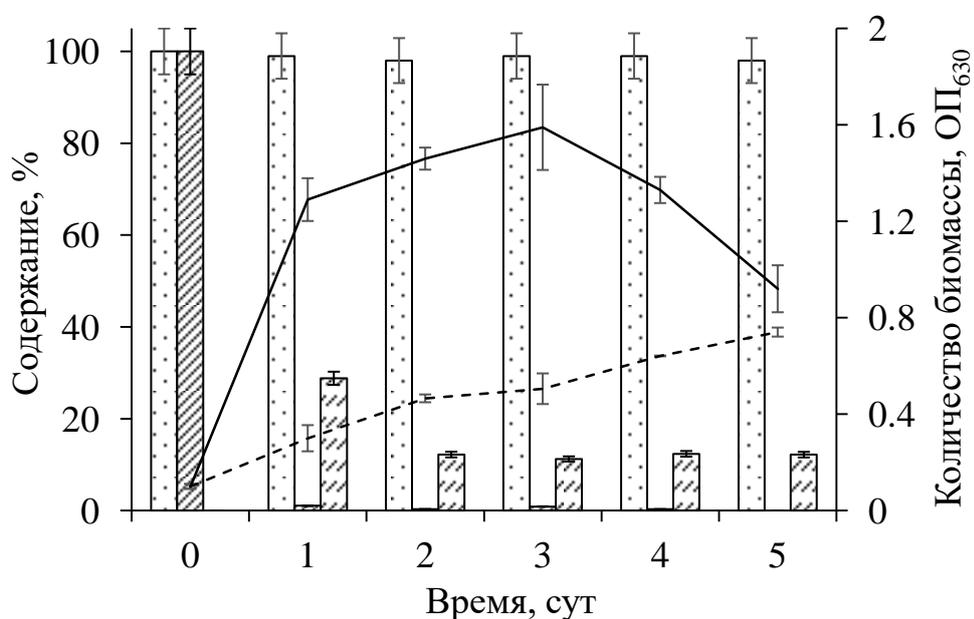


Рисунок 26 – Динамика трансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757: ОК (▨), соединение **114** (▩). Количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток в присутствии (—) и без (---) ОК. Приведены данные ВЭЖХ посткультуральных экстрактов

Динамика каталитической активности в отношении ГК и прироста биомассы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 совпадала с динамикой *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Так, максимум каталитической активности клеток приходился на 2 сут, а количество биомассы в процессе конверсии значительно превышало данный показатель биотического контроля (Рисунок 27).

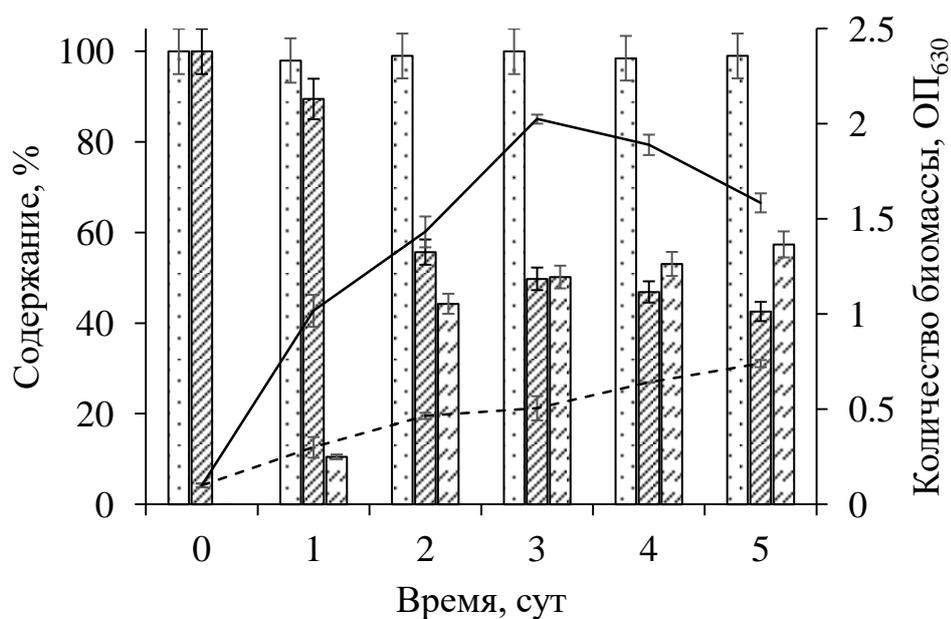


Рисунок 27 – Динамика трансформации ГК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757: ГК (▨), соединение **113** (▧), абиотический контроль (▩). Количество (ОП<sub>630</sub>) бактериальных клеток в присутствии (—) и без (---) ГК. Приведены данные ГХ-МС посткультуральных экстрактов

Для мониторинга процесса биотрансформации ОК и ГК был проведен анализ респираторной активности бактериальных клеток как одного из показателей их жизнеспособности и интенсивности метаболических процессов. Исследование респираторной активности показало, что независимо от используемого тритерпеноида максимум скорости поглощения кислорода совпадал с максимумом каталитической активности клеток (Рисунки 28А–31А). При этом общее количество поглощенного кислорода *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в присутствии ОК было в 1,2 раза ниже, чем в биотическом контроле, что подтверждает ранее выдвинутое предположение о подавляющем действии ОК на рост клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (Рисунок 28Б). Респираторная активность клеток *R. rhodochrous* 757 в процессе биотрансформации ОК характеризовалась резким повышением (от 0,9 до 5 мкл/час) скорости поглощения кислорода в течение 1 сут и сохранением значений данного показателя на одном (5–6 мкл/час) уровне в последующие 4 сут (Рисунок 29А). При этом снижение количества биомассы на 5 сут (см. Рисунок 26) сопровождалось резким падением скорости поглощения кислорода (Рисунок

29А). Общее количество поглощенного кислорода на 4–5 сут в присутствии ОК составляло в 2 раза больше, чем в биотическом контроле (Рисунок 29Б). Это свидетельствует об устойчивой метаболической активности и высокой жизнеспособности клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в присутствии данного тритерпенового субстрата.

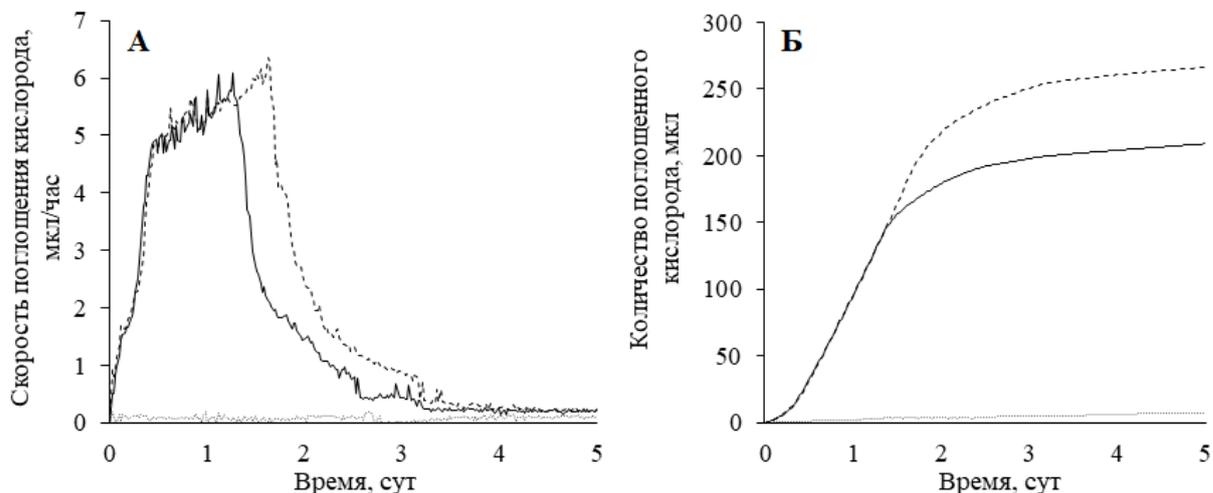


Рисунок 28 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного  $O_2$  (Б) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации ОК (—). Биотический контроль (---) и абиотический контроль (.....)

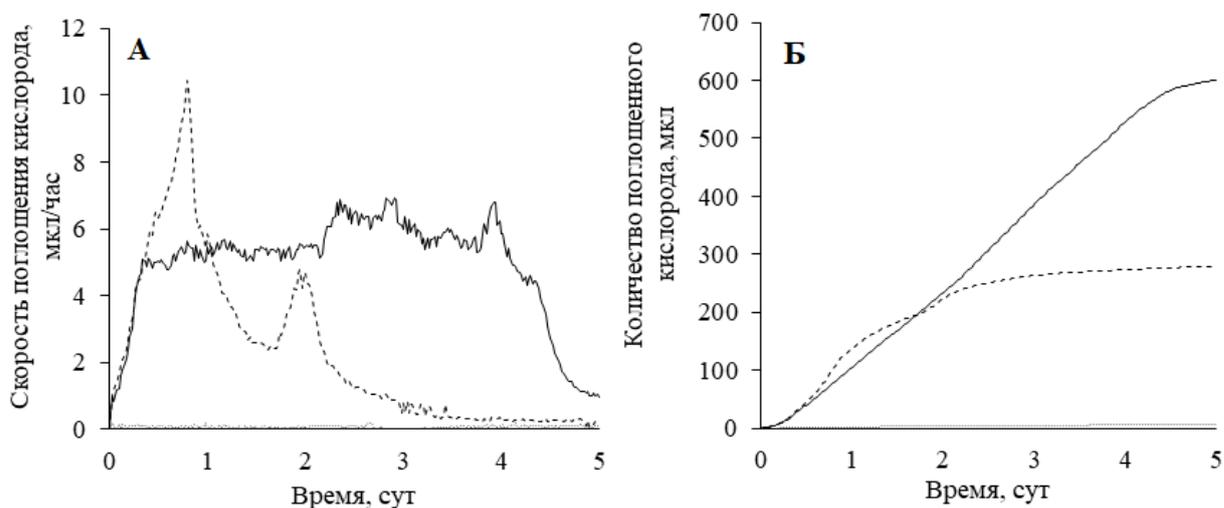


Рисунок 29 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного  $O_2$  (Б) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в процессе биотрансформации ОК (—). Биотический контроль (---) и абиотический контроль (.....)

Изучение респираторной активности бактериальных клеток обоих штаммов в присутствии ГК (Рисунки 30, 31) позволило выявить увеличение продолжительности экспоненциальной фазы роста родококков (около 2 сут),

сопровождающейся активным делением клеток, что соотносится с отмеченным ранее значительным приростом биомассы в течение первых 2–3 сут эксперимента и подтверждает отсутствие токсического эффекта ГК на метаболизм клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757.

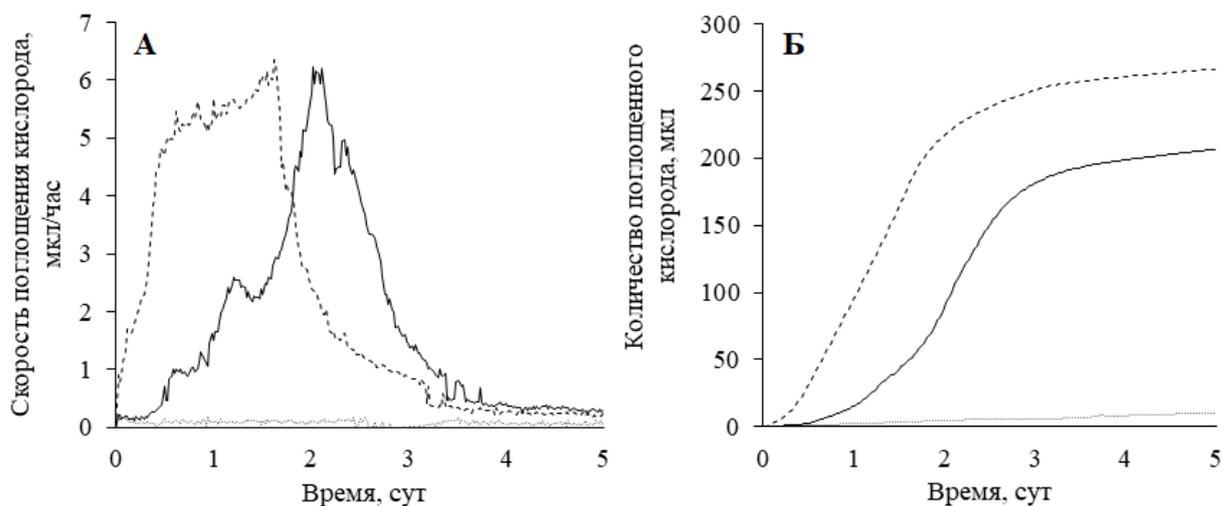


Рисунок 30 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного  $O_2$  (Б) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации ГК (—). Биотический контроль (---) и абиотический контроль (.....)

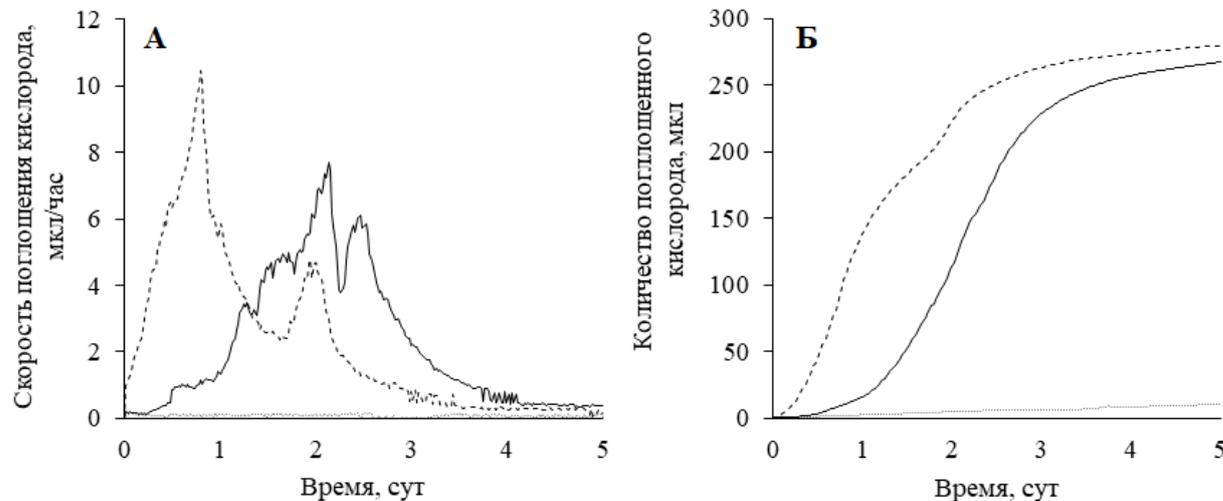


Рисунок 31 – Скорость поглощения (А) и количество поглощенного  $O_2$  (Б) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в процессе биотрансформации ГК (—). Биотический контроль (---) и абиотический контроль (.....)

Стоит отметить, что в контрольных экспериментах в абиотических условиях значения респирации и скорость трансформации ОК и ГК были практически равны нулю (см. Рисунки 28–31), что позволяет сделать вывод о биокаталическом характере окисления тритерпеноидов.

#### Глава 4. ВЛИЯНИЕ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ

По нашим данным, в процессе биотрансформации ОК родококки формируют компактные многоклеточные агрегаты (Рисунок 32А, В). По-видимому, образование агрегатов способствует проявлению устойчивой метаболической активности родококков в отношении сложных гидрофобных субстратов, обеспечивая высокую каталитическую активность в условиях, когда одиночные клетки не способны к размножению и биоконверсии субстрата. Стоит отметить, что агрегация является типичной ответной реакцией бактерий на присутствие в среде сложных труднометаболизируемых химических агентов и ранее была зарегистрирована при воздействии на родококки таких токсикантов как диклофенак натрия, дротаверин гидрохлорид и дегидроабиетиновая кислота (Мухутдинова, 2014; Cheremnykh *et al.*, 2018; Ivshina *et al.*, 2019).

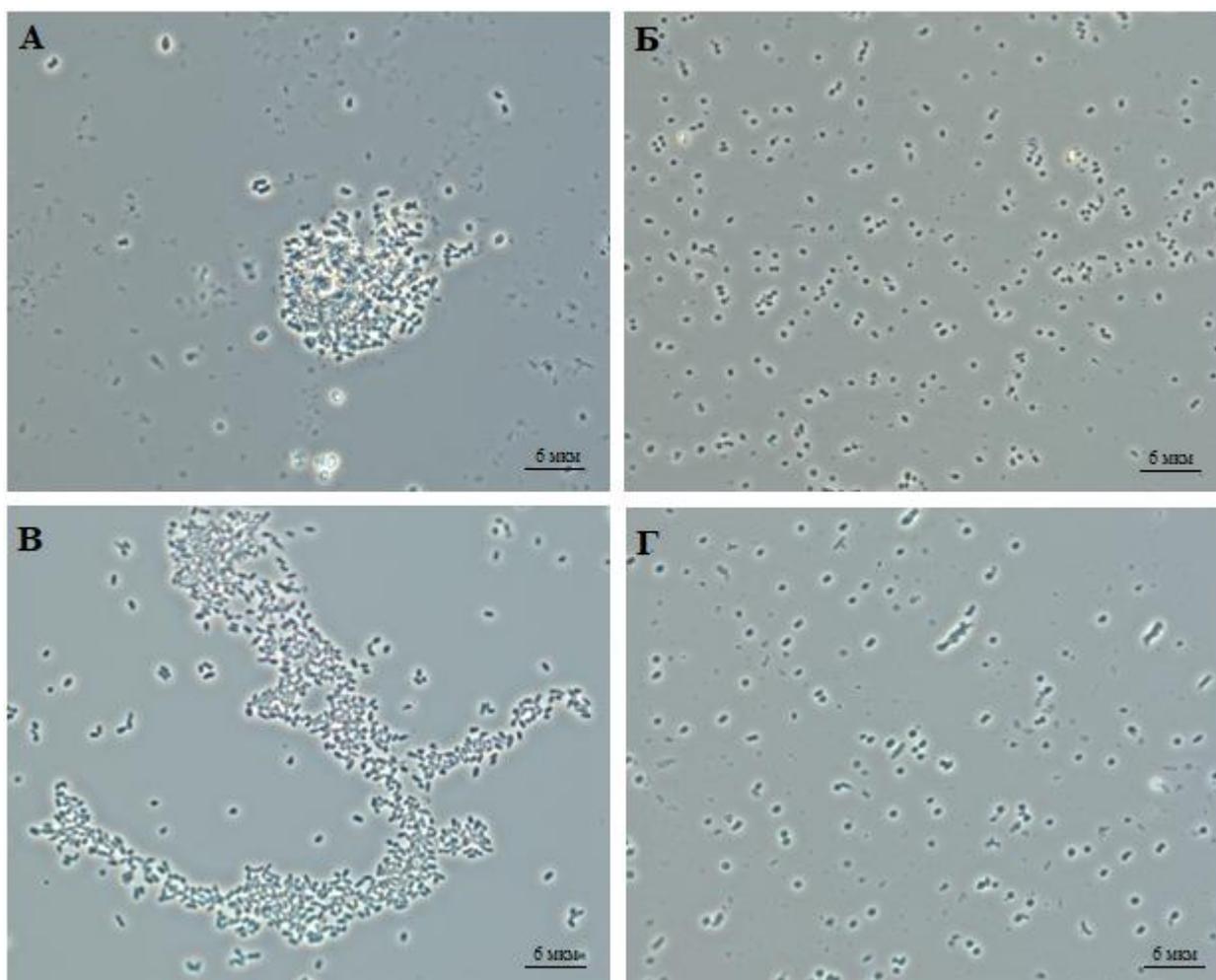


Рисунок 32 – Фазово-контрастная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (А, Б) и ИЭГМ 757 (В, Г) в присутствии (А, В) и без (Б, Г) ОК

Что касается образования агрегатов родококков в процессе биотрансформации ГК, то в первые 2 сут наблюдалось формирование крупных (50–150 мкм) клеточных агрегатов (Рисунок 33А, В), которые в течение последующих трех дней распадались на более мелкие, и на 5 сут их размер не превышал 20 мкм (Рисунок 33Б, Г). Вероятно, такой феномен связан с первичной адаптацией клеток к высокой концентрации ГК, тогда как по мере снижения нагрузки на метаболические системы клеток, необходимость в формировании многоклеточной системы отпадала, и клетки переходили к одиночному способу существования.

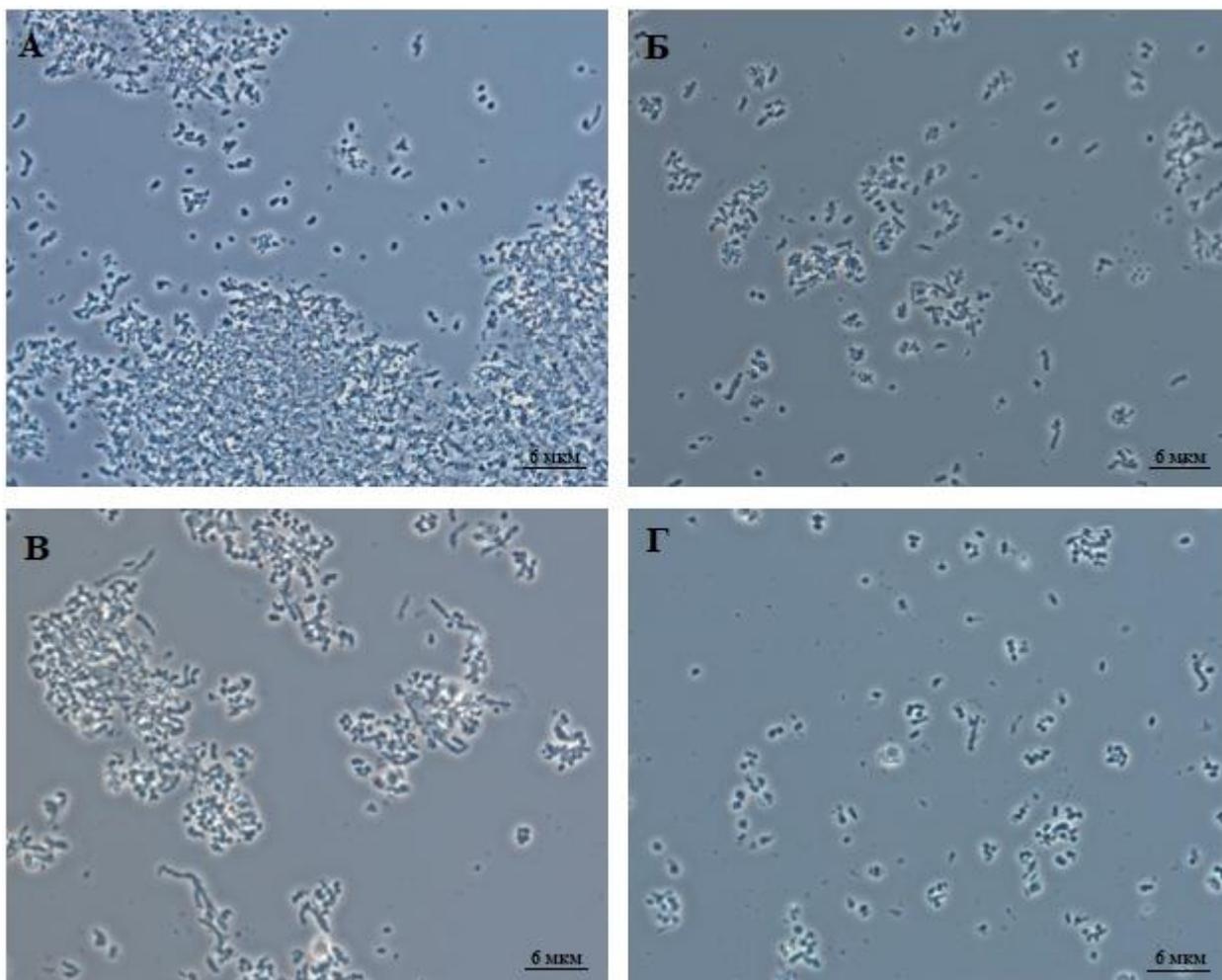


Рисунок 33 – Фазово-контрастная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (А, Б) и ИЭГМ 757 (В, Г) на 1 сут (А, В) и на 5 сут (Б, Г) процесса биотрансформации ГК

С использованием флуоресцентной микроскопии выявлено, что образующиеся в процессе биотрансформации агрегаты состоят в основном из живых клеток (Рисунки 34, 35). При этом в присутствии ОК отмечено достоверное увеличение количества липидных включений в клетках штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (Рисунок 34Б1). Известно, что липиды являются протекторами, которые способствуют изменению вязкости мембраны и тем самым защите оболочки от повреждений, а формирование внутриклеточных липидных включений является одним из механизмов ответа бактериальных клеток на стрессовые воздействия (Zhang *et al.*, 2017), что подтверждает, что ОК является фактором стресса для клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360.

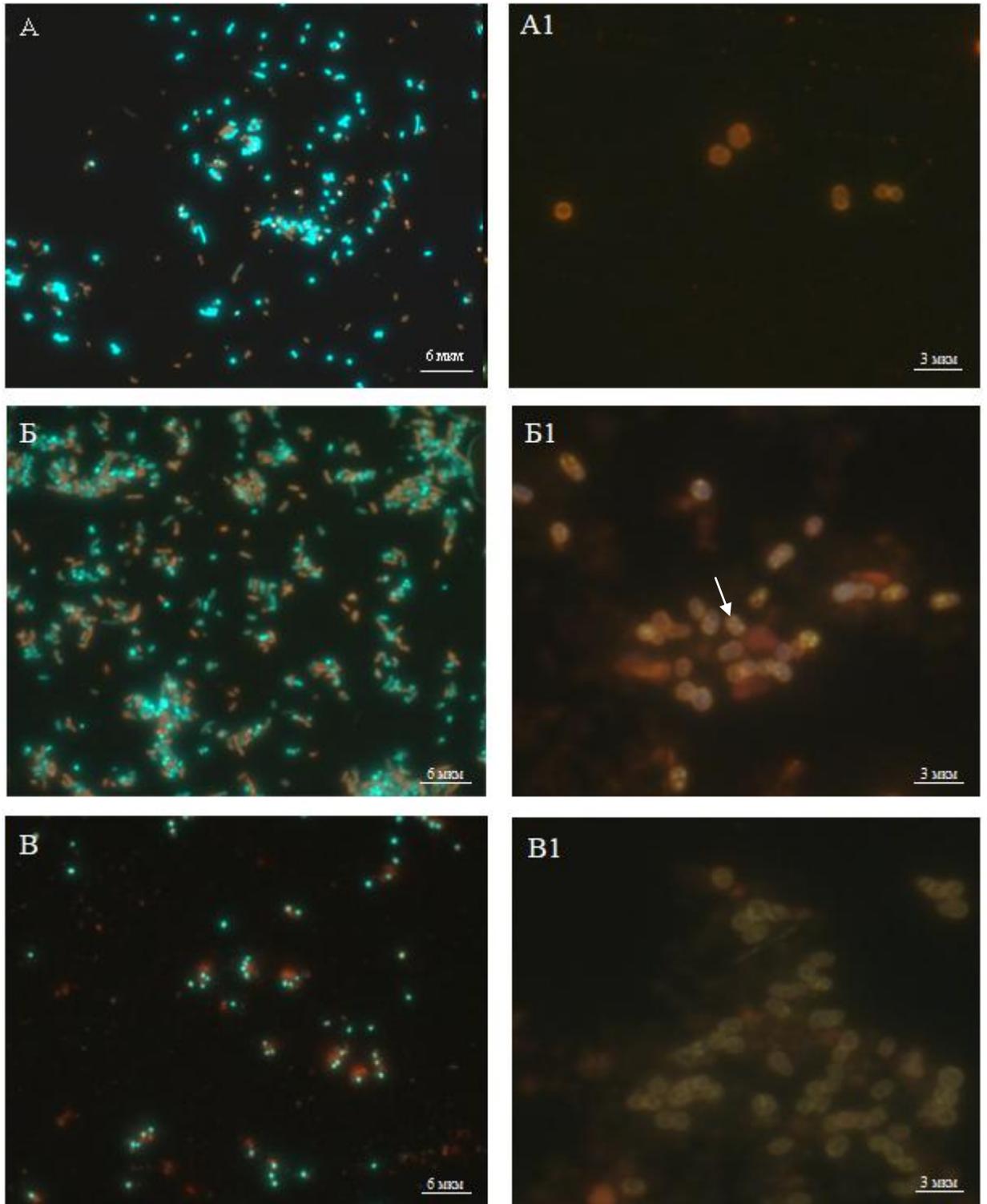


Рисунок 34 – Флуоресцентная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, окрашенных красителями Live/Dead<sup>®</sup> (А, биотический контроль) и Nile Red (А1, биотический контроль), в присутствии ОК (Б, Б1) или ГК (В, В1). Зеленые клетки – живые, красные клетки – мертвые. Стрелкой обозначены липидные включения

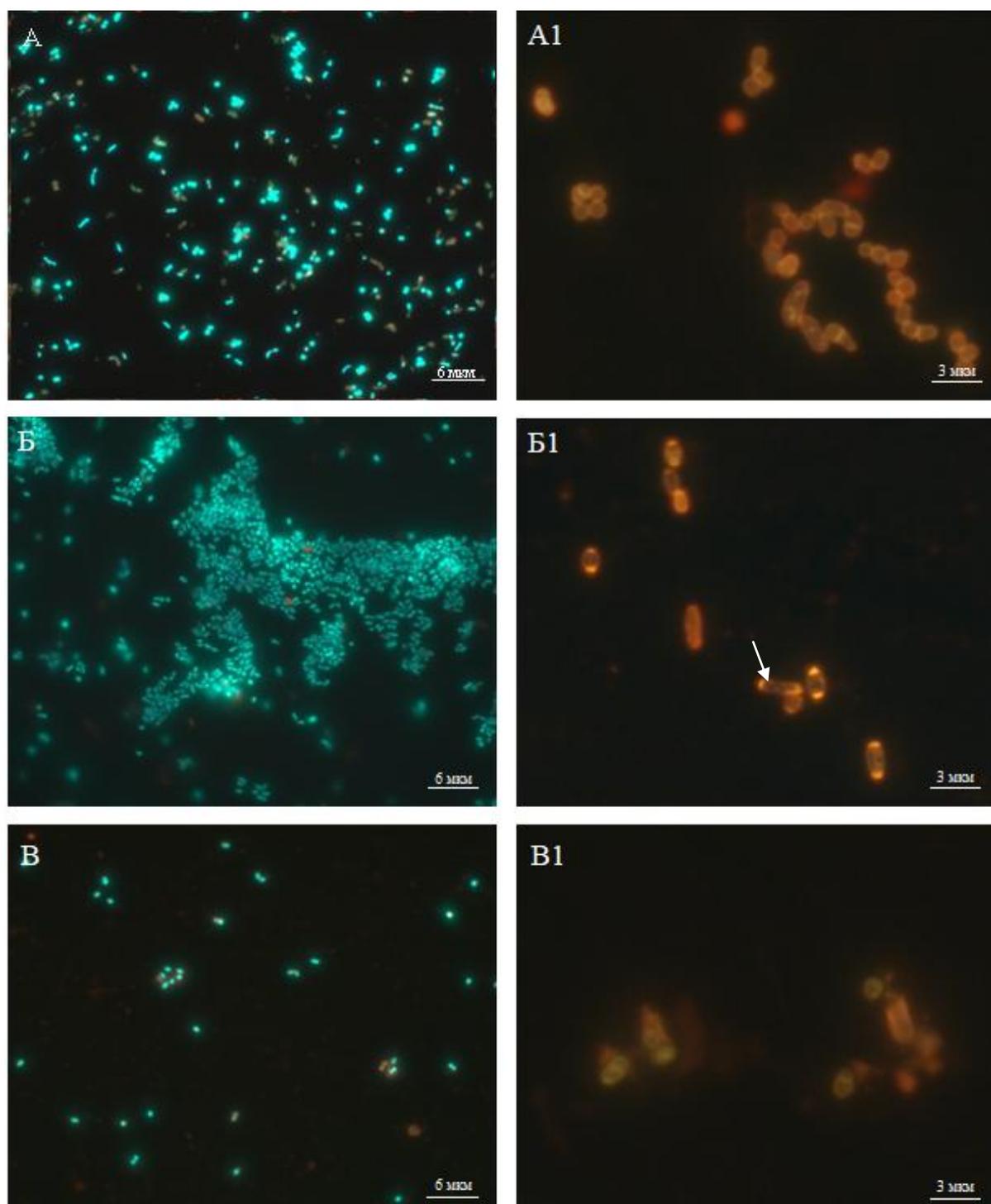


Рисунок 35 – Флуоресцентная микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, окрашенных красителями Live/Dead<sup>®</sup> (А, биотический контроль) и Nile Red (А1, биотический контроль), в присутствии ОК (Б, Б1) или ГК (В, В1). Зеленые клетки – живые, красные клетки – мертвые. Стрелкой обозначены липидные включения

Исследование элементного состава бактериальных клеток обоих штаммов показало, что независимо от условий среды культивирования распределение

основных элементов в бактериальных клетках происходит равномерно (Рисунки 36, 37). Однако в присутствии ОК у части клеток наблюдался цитотоксический эффект и нарушение целостности мембраны, о чем свидетельствовал выход калия из клеток (Рисунки 36, 37, обозначено стрелками), а также отмечались скопления фосфора и магния по периметру клеток. Образование гранул полифосфатов обычное явление, регистрируемое при росте бактериальных клеток как на богатых питательных, так и на селективных углеводородных средах. Полифосфаты, по-видимому, играют роль резервного вещества, обеспечивающего конкурентное преимущество родококков в природных условиях (Hernández *et al.*, 2008; Presentato *et al.*, 2018). Кроме того, фосфор и магний играют важную роль в процессах адгезии бактериальных клеток, что соотносится с полученными данными по образованию крупных многоклеточных агрегатов в присутствии ОК (Parikh *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). При этом в присутствии ГК не было обнаружено клеток с явным цитотоксическим эффектом и скоплением фосфора, магния или других элементов, что подтверждает ранее сделанный вывод о высокой устойчивости родококков к ГК.

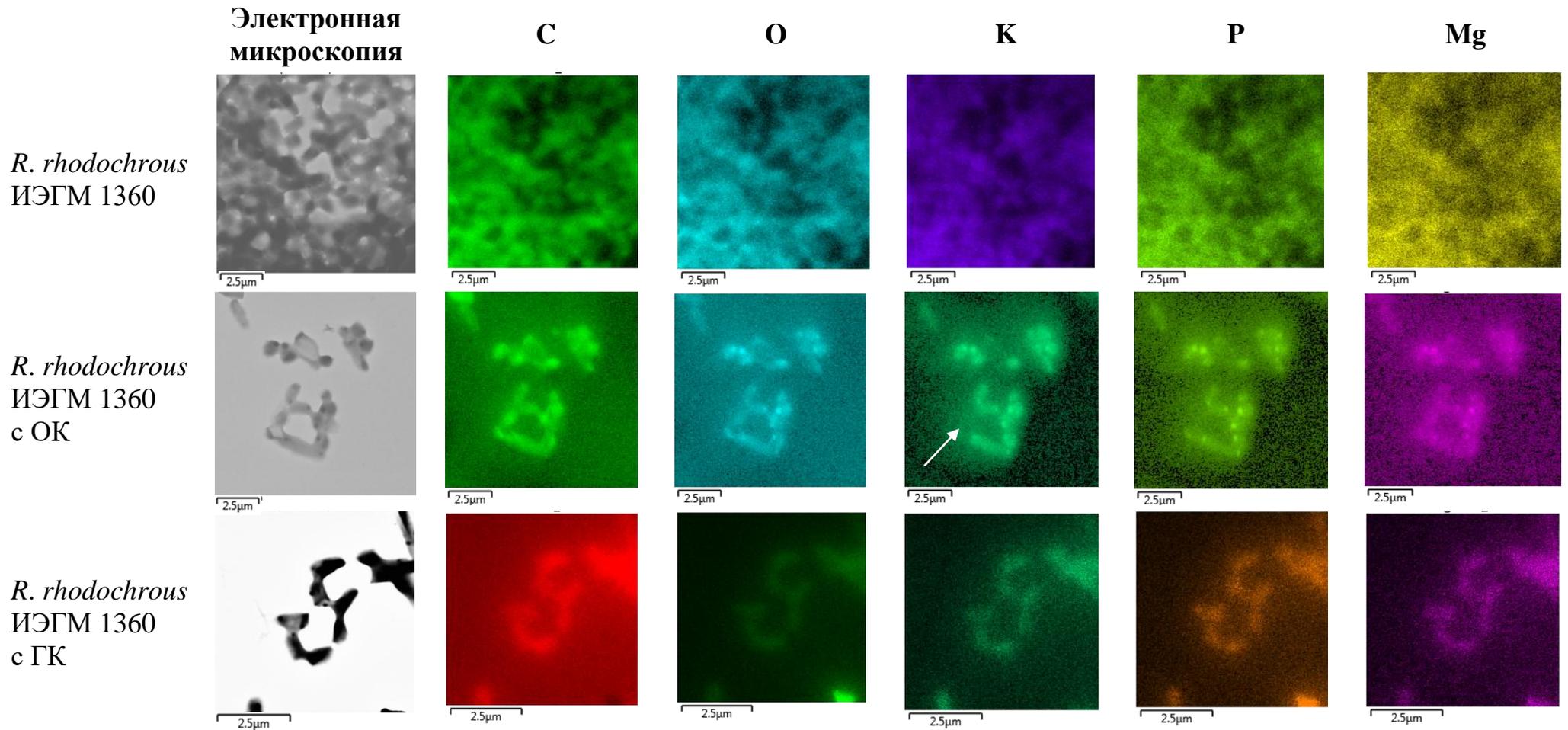


Рисунок 36 – Элементный состав клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, определенный путем картирования с помощью рентгеновского микроанализа. Распределение отдельных химических элементов отмечено цветом. Стрелкой обозначены клетки с выходом  $K^+$

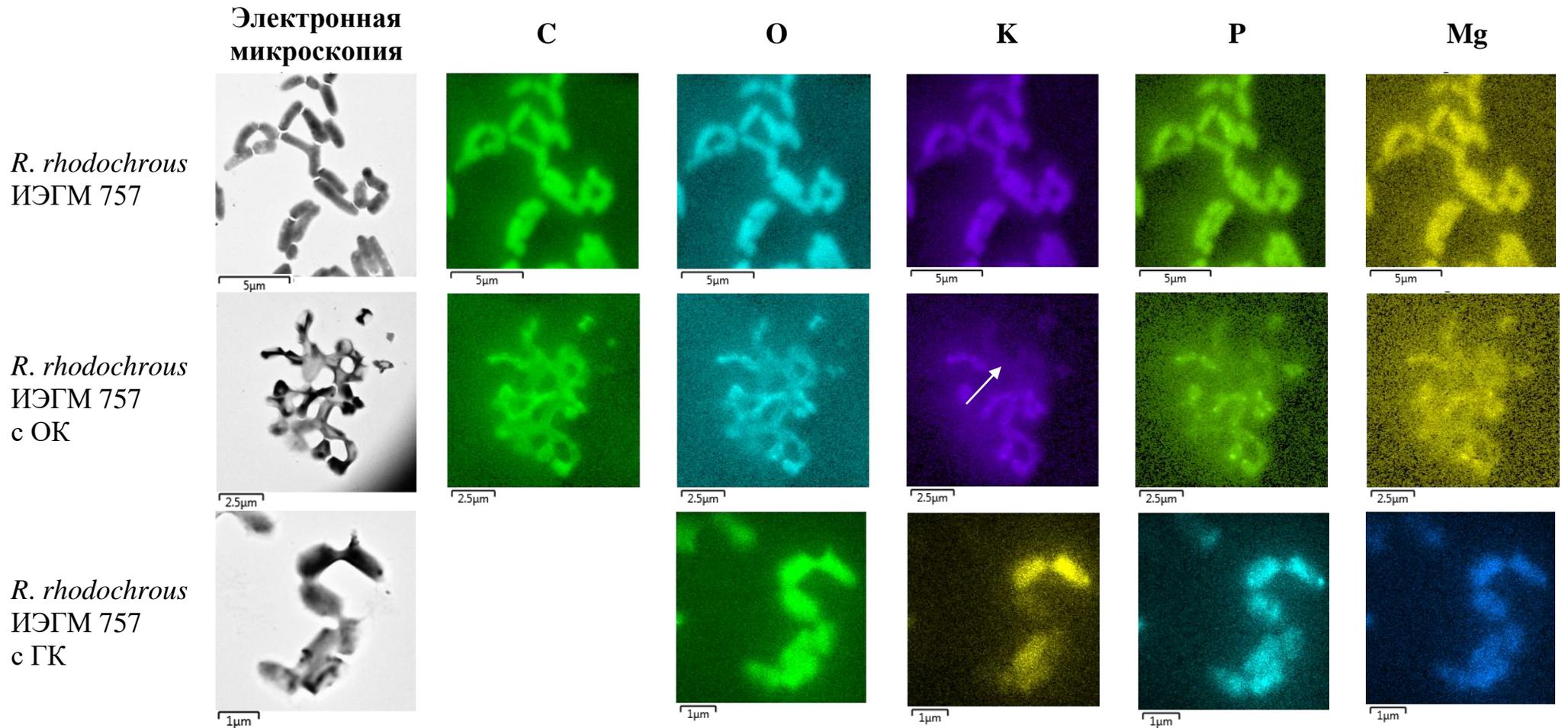


Рисунок 37 – Элементный состав клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, определенный путем картирования с помощью рентгеновского микроанализа. Распределение отдельных химических элементов отмечено цветом. Стрелкой обозначены клетки с выходом  $K^+$

Проведенный углубленный анализ ультраструктуры клеток обоих штаммов родококков методом ПЭМ подтвердил полученные нами данные по накоплению липидов внутри клеток, о чем свидетельствуют зарегистрированные электронно-прозрачные включения (Рисунки 38, 39). Ранее было показано, что при росте на углеводородных субстратах родококки продуцируют полигидроксиалканоаты (ПГА) в качестве запасных веществ, позволяющих клетке нормально функционировать в стрессовых условиях и при дисбалансе питательных элементов (Alvarez *et al.*, 1996). Детектированные нами включения также могут являться ПГА. Кроме того, в присутствии тритерпеноидов было отмечено разрастание клеточной стенки родококков в виде пилей и мембранных выступов. Поскольку клеточная стенка и ее поверхность являются основным местом аккумуляции субстратов, можно предположить, что избыточный рост клеточной стенки, увеличивающий ее поверхность, связан с созданием динамического депо, обеспечивающего фиксацию поступающего гидрофобного субстрата и последующее его окисление (Ившина и соавт., 2021). В присутствии тритерпеноидов у части клеток было детектировано образование микрокапсул, поверхностных структур в виде рыхлого слоя микрофибрилл полисахаридной природы (Рисунки 38Г, Д, 39Б, Д, Е). Такие микрокапсулы играют важную роль в процессах адгезии клеток и защиты их от действия токсических соединений (Iwabuchi *et al.*, 2003). Кроме того, на СЭМ-изображениях в присутствии ОК отмечено увеличение шероховатости клеточной стенки и аггломерация клеток с признаками адгезии (Рисунки 38В, 39Г).

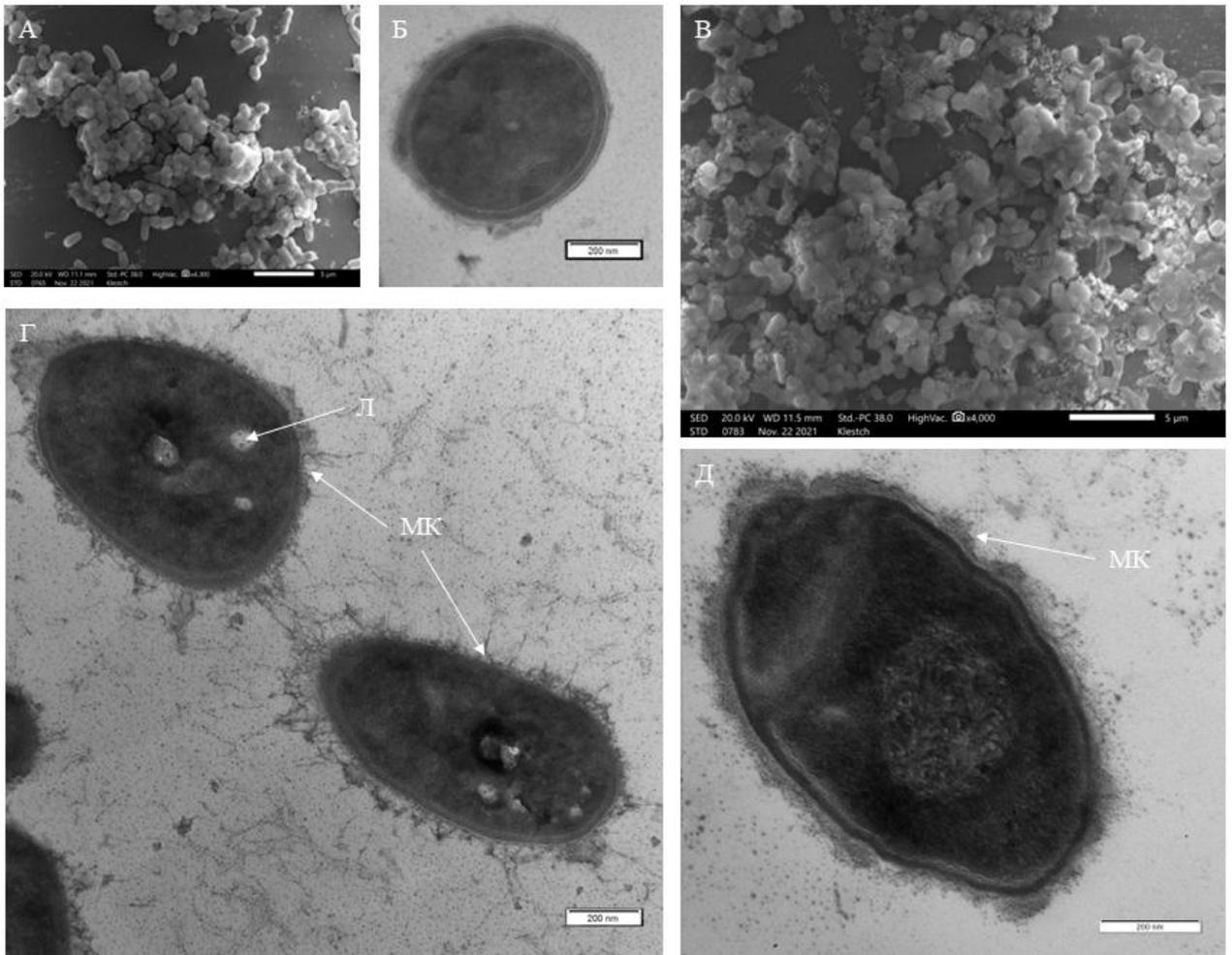


Рисунок 38 – СЭМ (А, В) и ПЭМ (Б, Г, Д) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 360 (А, Б, биотический контроль), выращенных в присутствии ОК (В, Г) или ГК (Д): Л, липидные включения; МК, микрокапсула. Масштаб линейки: 5 мкм (А, В), 200 нм (Б, Г, Д)

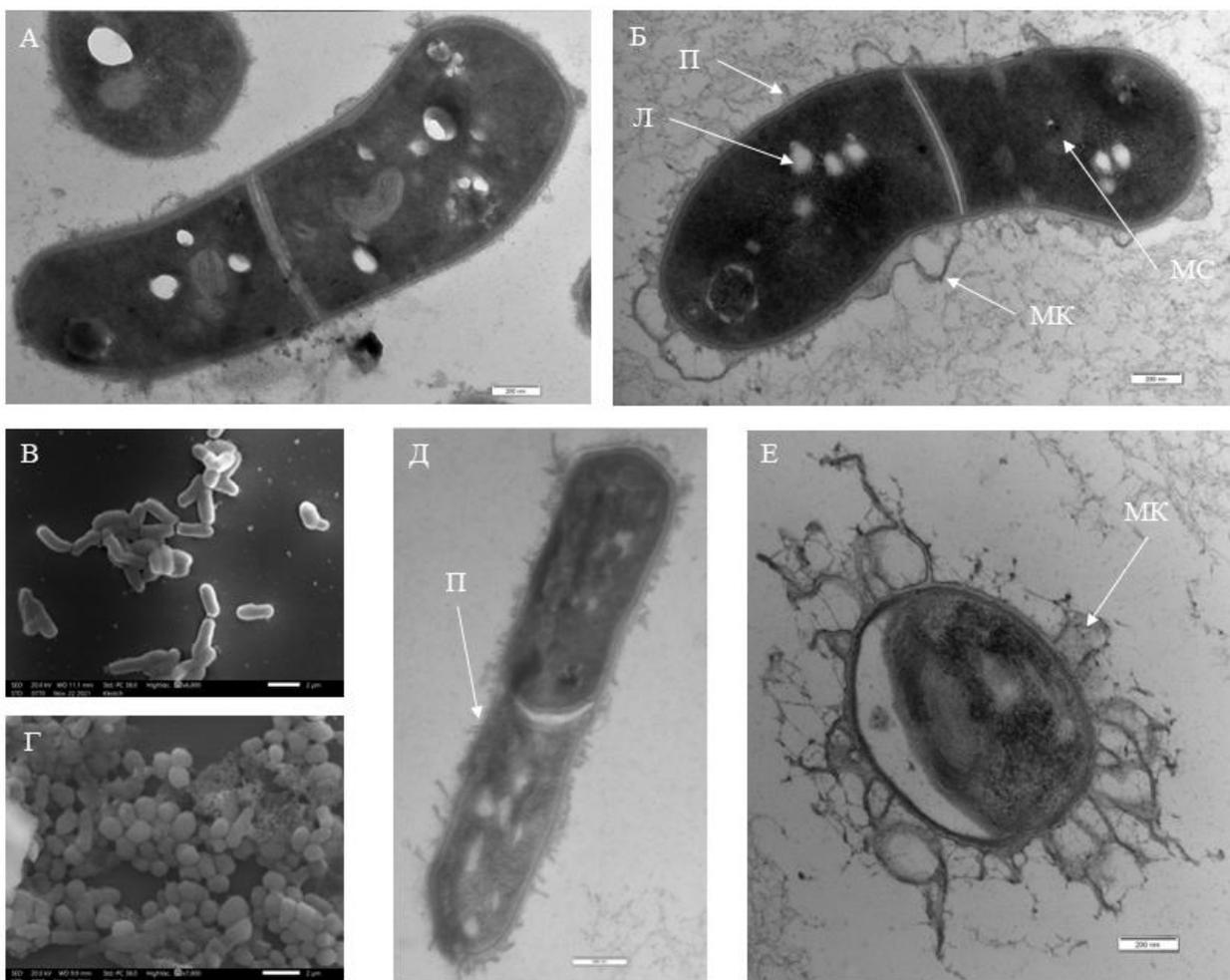


Рисунок 39 – СЭМ (В, Г) и ПЭМ (А, Б, Д, Е) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (А, В, биотический контроль), выращенных в присутствии ОК (Б, Г, Е) или ГК (Д): П, пили; Л, липидные включения; МК, микрокапсула; МС, мезосомоподобная структура. Масштаб линейки: 2 мкм (В, Г), 200 нм (А, Б, Д, Е)

Анализ морфометрических и физико-химических показателей клеток обоих штаммов родококков не выявил значимых изменений в присутствии ОК. При этом в присутствии нетоксичной ГК было отмечено увеличение площади и объема бактериальных клеток, что способствует увеличению площади их контакта с субстратом для лучшего его поглощения и потребления (Таблица 5).

Таблица 5 – Морфометрические и физико-химических показатели бактериальных клеток

Условия	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь (S), мкм <sup>2</sup>	Объем (V), мкм <sup>3</sup>	S/V, мкм <sup>-1</sup>	ζ-потенциал, мВ
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360						
Биотический контроль	1,22 ± 0,18	1,08 ± 0,11	5,99 ± 1,48	1,14 ± 0,44	5,42 ± 0,57	-30,3 ± 6,54
ОК	1,39 ± 0,14	1,17 ± 0,16	7,33 ± 1,55	1,54 ± 0,47	4,93 ± 0,59	-32,8 ± 7,09
ГК	1,55 ± 0,14*	0,99 ± 0,09	6,34 ± 0,86	1,19 ± 0,26	5,38 ± 0,37	-28,0 ± 7,18
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757						
Биотический контроль	1,33 ± 0,09	1,01 ± 0,09	5,85 ± 0,71	1,08 ± 0,21	5,49 ± 0,35	-38,9 ± 6,62
ОК	1,89 ± 0,33	1,00 ± 0,09	7,51 ± 1,36	1,49 ± 0,38	5,12 ± 0,46	-38,1 ± 7,12
ГК	2,03 ± 0,16*	1,10 ± 0,13	8,89 ± 0,94*	1,93 ± 0,34*	4,67 ± 0,41	-35,9 ± 6,54

Примечание. \*Данные достоверно ( $p < 0,05$ ) отличаются от контрольных значений.

## Глава 5. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ

### 5.1. Использование иммобилизованных клеток

Одним из распространенных способов оптимизации процесса биоконверсии гидрофобных органических соединений является иммобилизация бактериальных клеток (Kylosova *et al.*, 2016; Krivoruchko *et al.*, 2019). В настоящей работе для сравнения эффективности биотрансформации ОК и ГК свободными (планктонными) и закрепленными клетками использовали прием адсорбционной иммобилизации родококков на твердых носителях.

По нашим данным, использованные в работе техническая ткань и полипропиленовые диски обладали крайне низкой (не более 7%) адсорбционной емкостью в отношении клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 (Рисунок 40). Кроме того, полученные биокатализаторы обладали и низкой каталитической активностью в отношении ОК и ГК, остаточная концентрация которых в трансформационной среде на 5 сут составляла более 90%. Ранее аналогичная тенденция значительного снижения трансформационной активности была отмечена при конверсии ОК иммобилизованными в альгинат клетками *Nocardia iowensis* (Ludwig *et al.*, 2015). Вероятно, данное явление связано со снижением доступности гидрофобных тритерпеновых субстратов для клеток, закрепленных на поверхности или в толще носителя.

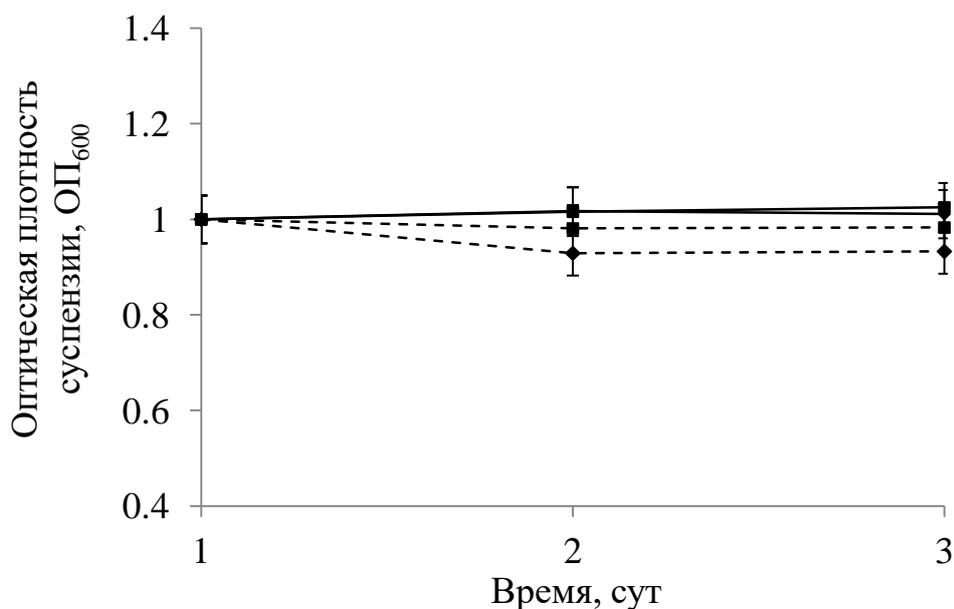


Рисунок 40 – Динамика адсорбции клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (сплошная линия) и ИЭГМ 757 (пунктирная линия) на поверхности технической ткани (■) и полипропиленовых дисков (◆)

## 5.2. Использование суспензий нерастаущих клеток

Применение так называемых нерастаущих клеток (*resting cells*), т.е. (в нашем понимании) клеток в стадии стационарной фазы роста, отмытых от источников питания, является одним из широко распространенных методов оптимизации процессов биоконверсии органических соединений. В литературе описано много примеров использования таких клеток для биотрансформации  $\beta$ -ситостерола, андростендиона, дегидроабиетиновой кислоты, бетулина и других соединений (Иванова и соавт., 2022; Angelova *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2009; Ivshina *et al.*, 2012; Grishko *et al.*, 2013). Данный подход заключается в использовании биомассы, отделенной от среды выращивания и ресуспендированной в буферном растворе. Отсутствие ростовых факторов позволяет регулировать количество биомассы и ее физиологическое состояние, что способствует повышению эффективности и сокращению продолжительности целевого процесса. В то же время использование в качестве среды биотрансформации рН-буфера позволяет снизить риск бактериального

загрязнения, ограничить рост посторонней микрофлоры, облегчить процесс выделения метаболитов.

Отсутствие активного роста биомассы в процессе биотрансформации было подтверждено путем измерения оптической плотности суспензий нерастаущих клеток ( $OP_{600}$ ), которая статистически значимо не изменялась в течение всего эксперимента (Рисунки 41, 42). Исходное повышение  $OP_{600}$  суспензий (Рисунки 41, 42; 0 сут) по сравнению с биотическим контролем связано с внесением гидрофобных ОК или ГК в трансформационную среду.

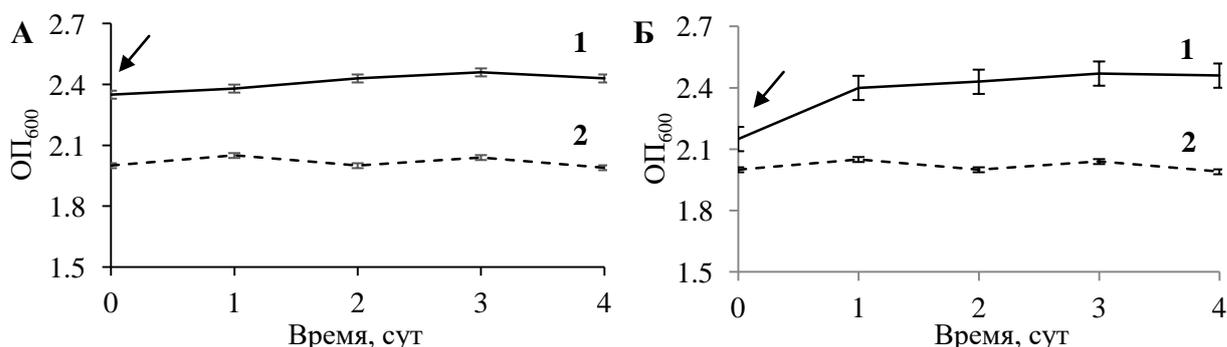


Рисунок 41 – Динамика изменения оптической плотности ( $OP_{600}$ ) суспензии нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации (1) ОК (А) и ГК (Б), 2 – биотический контроль. Стрелками обозначено внесение ОК и ГК

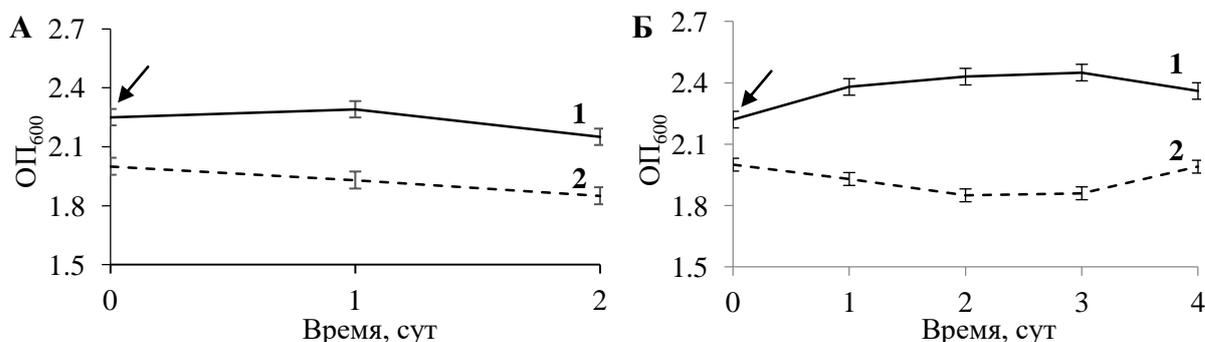


Рисунок 42 – Динамика изменения оптической плотности ( $OP_{600}$ ) суспензии нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в процессе биотрансформации (1) ОК (А) и ГК (Б), 2 – биотический контроль. Стрелками обозначено внесение ОК и ГК

Известно, что родококки способны выживать при экстремальных значениях pH от 1,0 до 11,0, однако оптимальными для них являются нейтральные значения pH (Pátek *et al.*, 2021). По нашим данным, значительному сокращению продолжительности процесса биотрансформации ОК и ГК

способствовало использование буферных растворов с рН 8,0 и 6,0 соответственно. Так, биотрансформация ОК суспензиями нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 с ОП<sub>600</sub> 2,0 в буфере рН 8,0 сопровождалась образованием 14% окисленного производного ОК (**112**) в течение 3 сут и 90% соединения **114** в течение 1 сут соответственно. Тогда как использование суспензий с ОП<sub>600</sub> 2,0 в буфере рН 6,0 для биотрансформации ГК приводило к образованию 31 и 23% окисленного производного (**113**) в течение 3 сут соответственно.

В ранних исследованиях по биоконверсии различных органических соединений с использованием нерастущих клеток *Rhodococcus* была показана взаимосвязь между каталитической активностью и оптической плотностью биомассы (Grishko *et al.*, 2013; Nawawi *et al.*, 2016). Полученные нами данные по биотрансформации ОК и ГК подтвердили выявленную ранее зависимость (Рисунки 43–46). Показано, что конверсия ОК происходит наиболее эффективно при использовании суспензии *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с ОП<sub>600</sub> 2,6 (Рисунок 43, концентрация клеток 19±0,95 г/л), а *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 с ОП<sub>600</sub> 2,0 (Рисунок 45, концентрация клеток 11±0,55 г/л). Тогда как конверсия ГК (Рисунки 44, 46) – при использовании суспензии обоих штаммов с ОП<sub>600</sub> 2,2 (концентрация клеток 12±0,62 г/л). Возможно, количество биомассы, необходимой для эффективной трансформации кислот коррелирует с устойчивостью бактериальных клеток к используемому тритерпеноиду. Стоит отметить, что увеличение количества биомассы до ОП<sub>600</sub> 2,8 (концентрация клеток 28–31 г/л) приводило к снижению уровня биоконверсии как ОК, так и ГК, что соотносится с полученными ранее результатами по биотрансформации бетулина нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 (Grishko *et al.*, 2013). Наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен снижением массопереноса и парциального давления кислорода при увеличении плотности биомассы клеток и перераспределением субстрата в буферной системе.

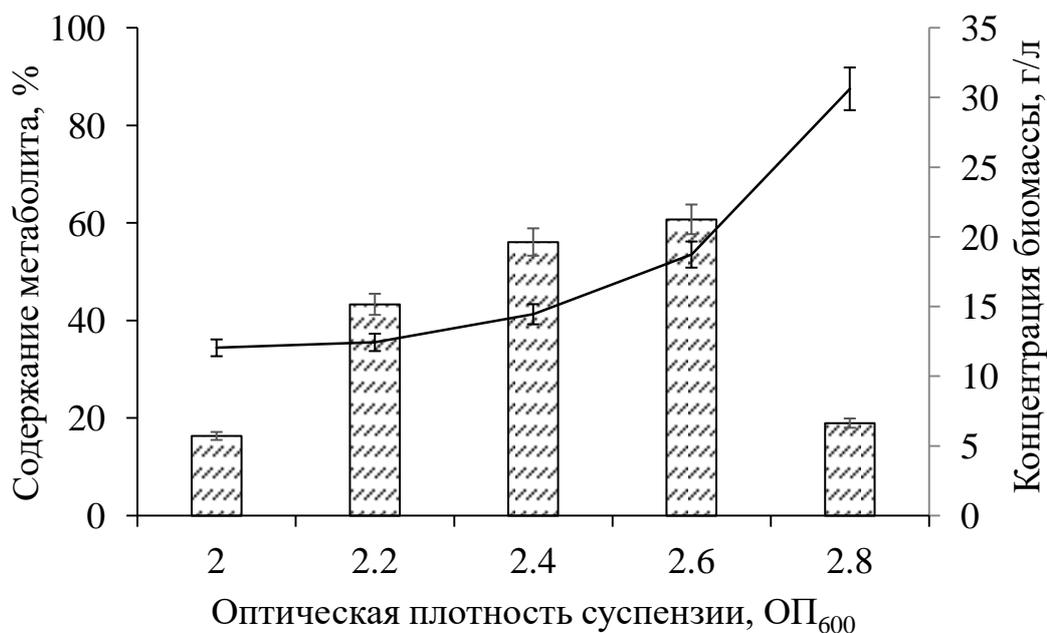


Рисунок 43 – Содержание метаболита **112** (▨) в экстрактах, полученных после 3 сут процесса биотрансформации ОК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в буфере с рН 8,0



Рисунок 44 – Содержание метаболита **113** (▨) в экстрактах, полученных после 3 сут процесса биотрансформации ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в буфере с рН 6,0



Рисунок 45 – Содержание метаболита **114** (▨) в экстрактах, полученных после 1 сут процесса биотрансформации ОК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в буфере с рН 8,0

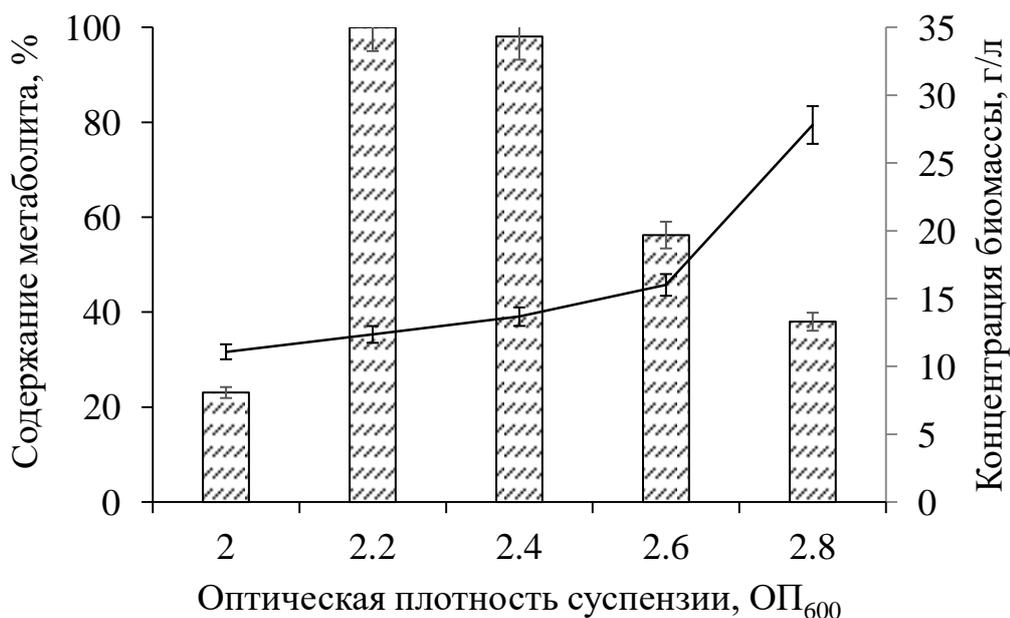


Рисунок 46 – Содержание метаболита **113** (▨) в экстрактах, полученных после 3 сут процесса биотрансформации ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в буфере с рН 6,0

Таким образом, наиболее эффективным для биотрансформации ОК и ГК является использование суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с ОП<sub>600</sub> 2,6 в буфере с рН 8,0 и ОП<sub>600</sub> 2,2 в буфере с рН 6,0 соответственно

и *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 с ОП<sub>600</sub> 2,0 в буфере с рН 8,0 и ОП<sub>600</sub> 2,2 в буфере с рН 6,0 соответственно.

Стоит отметить, что ОК обладает сниженной растворимостью в буфере с рН 8,0 (4 мг/л) по сравнению с буферами с рН 5,0; 6,0; 7,0; 9,0, а ГК в буфере с рН 6,0 (4 мг/л) по сравнению с буферами с рН 5,0; 7,0; 8,0; 9,0 (Рисунок 47). Возможно, высокая каталитическая активность клеток в отношении ОК и ГК в условиях буферов с рН 8,0 и рН 6,0 соответственно обусловлена характером их взаимодействия с кристаллическим субстратом, а именно возможностью формирования агрегатов на поверхности частиц ОК и ГК. По данным Atrat с соавт. (1991), механизм взаимодействия *Mycobacterium fortuitum* с частицами ситостерола характеризуется так называемой «иммобилизацией клеток на частицах субстрата», образованием стабильных агрегатов клеток на поверхности частиц. С использованием электронной микроскопии авторы показали, что потребление субстрата идет благодаря непосредственному контакту между клетками и частицами субстрата, где образуется многокомпонентная подвижная мезофаза, состоящая из гликолипидов, синтетических детергентов, стерола и воды, функция которой состоит в постепенном растворении субстрата, запуске механизма его транспорта в клетку и трансформации.

Известно, что актиномицеты, взаимодействуя с гидрофобными соединениями, синтезируют гликолипидные биосурфактанты, функция которых также состоит в растворении субстрата и запуске механизма транспорта его в клетку (Ivshina *et al.*, 1998). Ранее было показано, что процесс биотрансформации терпеноидов бетулина и дегидроабиетиновой кислоты сопровождается адгезией клеток на поверхности субстратов и образованием внеклеточной липофильной жидкости – биосурфактанта (Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018). Если предположить, что трансформация ОК и ГК родококками протекает схожим образом, то высокая каталитическая активность в отношении кристаллических частиц ОК и ГК может быть обусловлена образованием многокомпонентной подвижной мезофазы или биосурфактанта,

детектируемых с использованием АСМ и совмещенного АСМ-КЛСМ сканирования (Рисунки 48, 49). Кроме того, признаки адгезии бактериальных клеток к тритерпеновым субстратам в ростовых условиях были обнаружены на СЭМ-изображениях (см. Рисунки 36Б, 37Г).

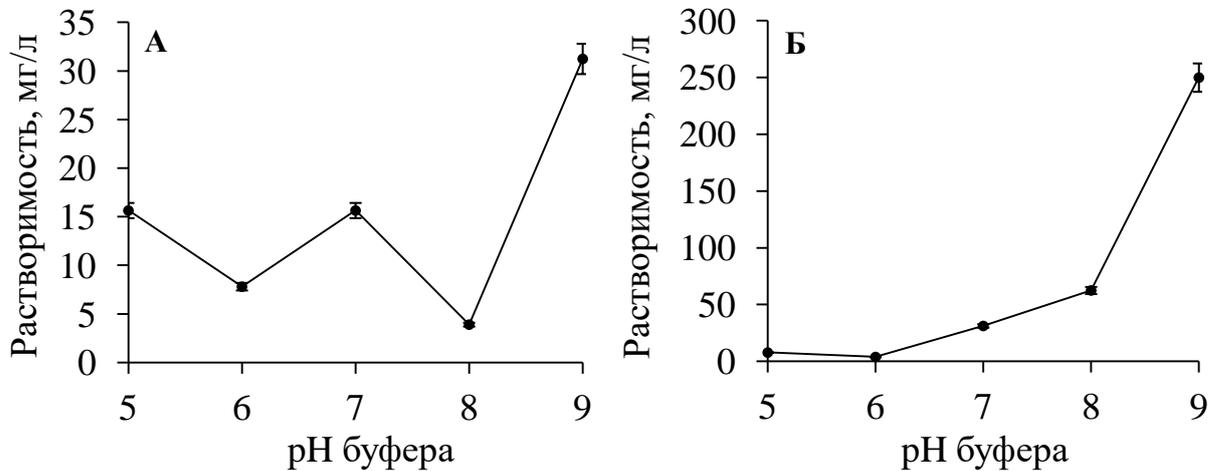


Рисунок 47 – Растворимость ОК (А) и ГК (Б) в буферах с различной рН

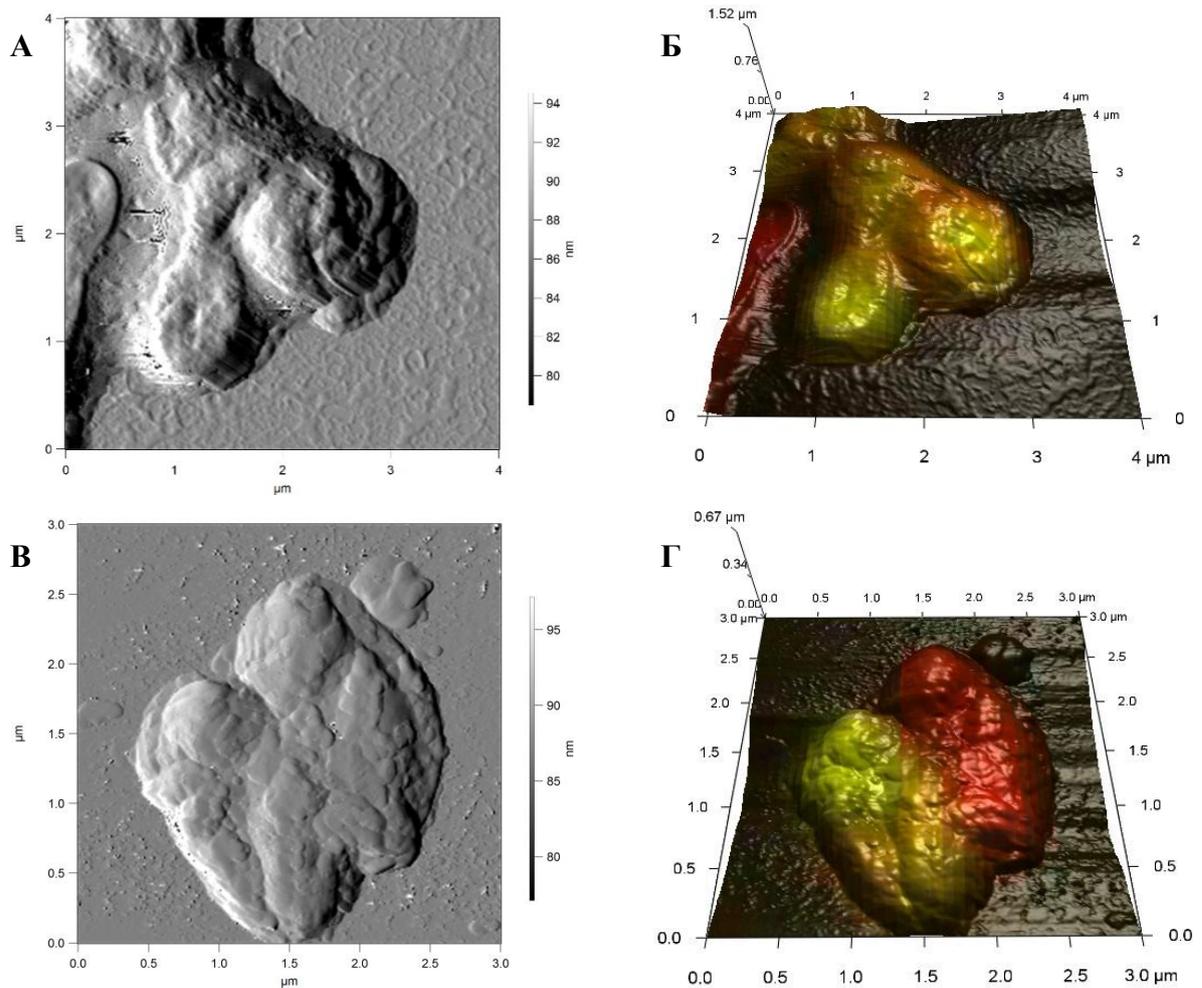


Рисунок 48 – АСМ и совмещенные АСМ-КЛСМ изображения не растущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в присутствии ОК (А, Б) и ГК (В, Г)

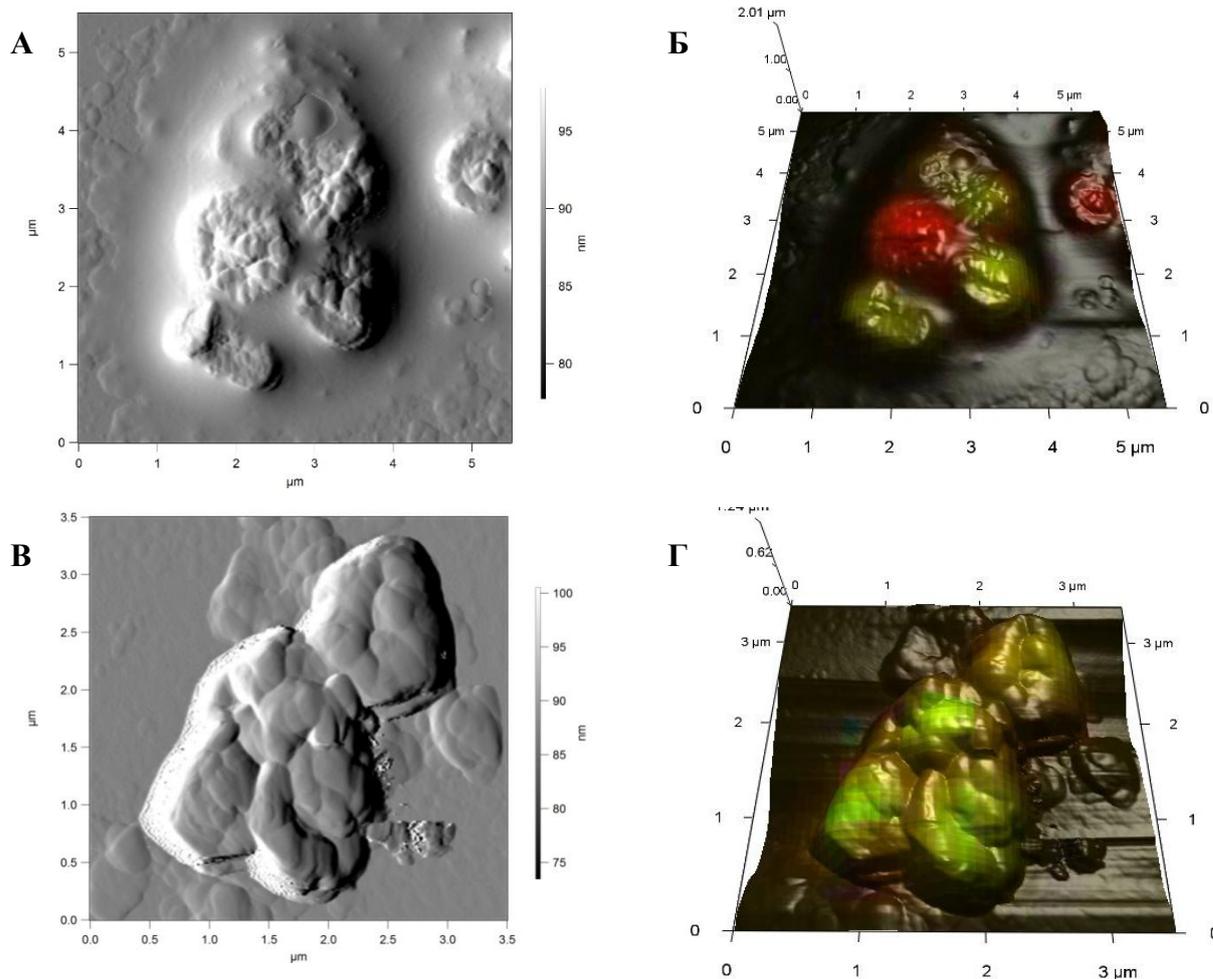


Рисунок 49 – АСМ и совмещенные АСМ-КЛСМ изображения нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 в присутствии ОК (А, Б) и ГК (В, Г)

Проведение морфометрических исследований позволило выявить, что воздействие ОК на нерастущие клетки, в отличие от активно растущей культуры, индуцировало снижение соотношения площади поверхности клеток к их объему и повышение шероховатости клеточной стенки (Таблица 6). Изменение рельефа и повышение шероховатости клеточной поверхности может являться следствием секреции внеклеточных полимеров (см. Рисунки 48, 49) и изменением липидного состава клеточной стенки, что повышает Ван-дер-Ваальсовы силы, которые способствуют лучшей адгезии клеток к субстрату (Uzoechi, Abu-Lail, 2019). По-видимому, выявленные изменения морфометрических показателей обеспечивают более эффективный контакт клеток с субстратом и обуславливают повышенный уровень его конверсии.

Таблица 6 – Морфометрические показатели нерастущих клеток

Условия	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь, мкм <sup>2</sup>	Объем, мкм <sup>3</sup>	Относительная площадь, мкм <sup>-1</sup>	Шероховатость, нм
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360						
Биотический контроль	1,54±0,14	1,12±0,05	7,33±0,43	1,49±0,13	4,90±0,14	151,41±10,32
ОК	1,65±0,17	1,20±0,07	8,49±0,77	1,87±0,25	4,56±0,20*	232,63±18,42*
ГК	1,44±0,08	1,11±0,10	6,98±0,80	1,40±0,25	5,02±0,36	170,04±55,31
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757						
Биотический контроль	1,65±0,26	1,14±0,11	7,91±1,15	1,68±0,37	4,79±0,32	153,56±30,87
ОК	2,13±0,34	1,49±0,20	13,62±3,57	3,86±1,50	3,69±0,49*	279,34±54,17*
ГК	1,65±0,22	1,21±0,13	8,67±1,94	1,97±0,64	4,56±0,51	270,99±72,98*

Примечание. \*Данные достоверно ( $p < 0,05$ ) отличаются от контрольных значений.

## Глава 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Сравнение масс-спектров метиловых эфиров полученных соединений **112** и **113** с масс-спектрами известных веществ из библиотеки NIST08 MS Library показало, что они соответствовали масс-спектрам метиловых эфиров 3-оксо-олеан-12-ен-28-овой ( $m/z$  468,3 (M<sup>+</sup>), Рисунок 50) и 3,11-диоксо-олеан-12-ен-30-овой ( $m/z$  482,3 (M<sup>+</sup>), Рисунок 51) кислот соответственно. Структуры полученных соединений были подтверждены с использованием ЯМР-спектроскопии.

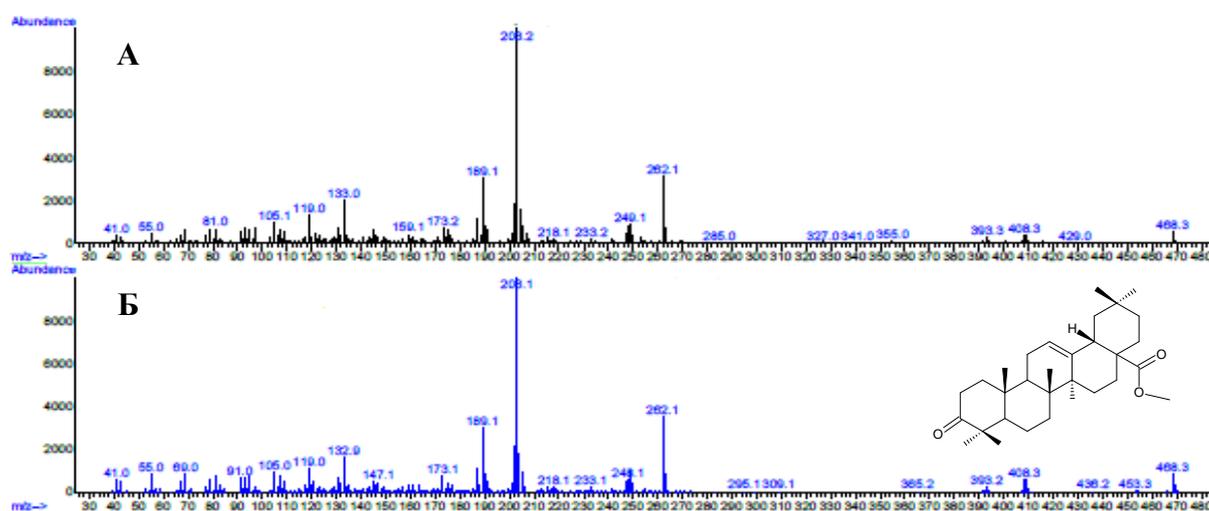


Рисунок 50 – Масс-спектры метилированного продукта биотрансформации ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (А, соединение **112**) и стандартного метилового эфира 3-оксо-олеан-12-ен-28-овой кислоты (Б)

Ранее 3-оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота (3-оксо-ОК, **112**), также известная как олеаноновая кислота, была получена при использовании в качестве биокатализаторов актиномицетов *Nocardia iowensis* DSM 45197 (Ludwig *et al.*, 2015). Однако нокардии проявляли каталитическую активность при концентрации ОК в среде 0,3 г/л, при этом продолжительность процесса биотрансформации составляла 13 сут. Необходимо отметить, что нокардии параллельно катализировали образование еще двух производных: метилового эфира ОК и не идентифицированного авторами соединения с дополнительными гидроксильной и метильной группами. Известно, что 3-оксо-ОК обладает

выраженным цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака молочной железы (4T1), гортани (HEp2) (Irungu *et al.*, 2014), легких (A549, H460), клеток карциномы желудка (HGC27) (Wu *et al.*, 2011) и меланомы (B16-BL6) (Huang *et al.*, 2006). Продемонстрирована антипаразитарная активность 3-оксо-ОК в отношении нематод *Meloidogyne incognita* (Begum *et al.*, 2015) и простейших *Leishmania amazonensis* и *Trypanosoma cruzi* (Funari *et al.*, 2016). Кроме того, было показано, что присутствие оксо-группы при С3 атоме ОК способствует увеличению ингибирующего эффекта соединения в отношении 5-липоксигеназной активности и соответствующих воспалительных процессов *in vivo* (Giner-Larza *et al.*, 2001).

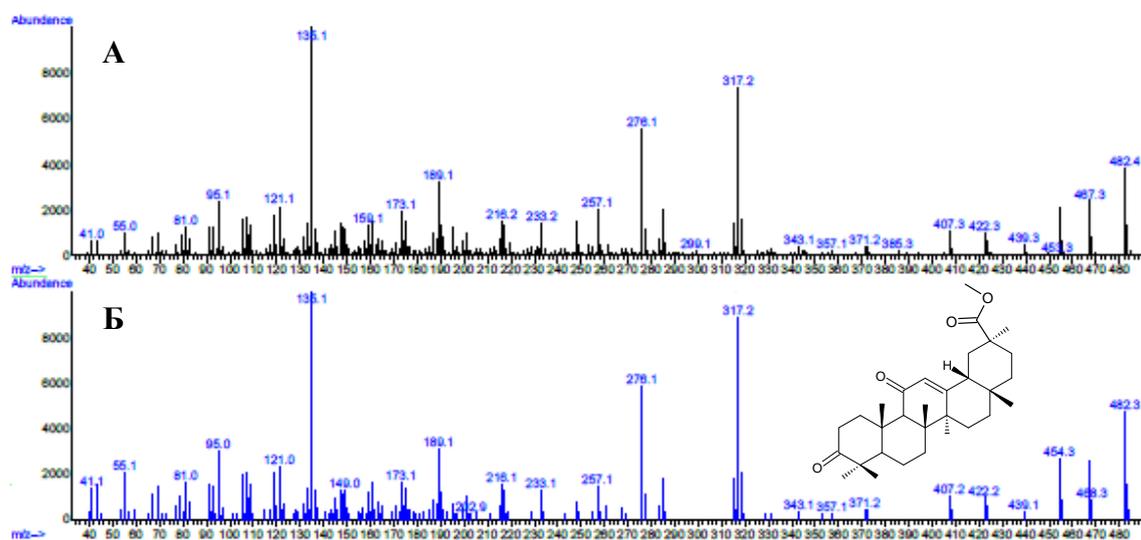


Рисунок 51 – Масс-спектры метилированного продукта биотрансформации ГК штаммами *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 (А, соединение **113**) и стандартного метилового эфира 3,11-диоксо-олеан-12-ен-30-овой кислоты (Б)

3,11-Диоксо-олеан-12-ен-30-овая кислота (3-оксо-ГК, **113**) ранее была получена при трансформации 0,4 г/л ГК с использованием мицелиальных грибов *Fusarium lini* (выход продукта 4,0%, продолжительность процесса 12 сут). Известно, что 3-оксо-ГК обладает ингибирующей активностью в отношении липоксигеназ, что определяет её противовоспалительный эффект (Choudhary *et al.*, 2009). Методом молекулярного докинга *in silico* была показана потенциальная ингибирующая активность 3-оксо-ГК в отношении протеазы M<sup>PRO</sup> вируса SARS-CoV-2 (Florez, Singh, 2020).

При анализе экстрактов, полученных по завершению (через 5 сут) процесса биотрансформации ОК с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, нами было детектировано образование соединения с  $R_f$  0,01 (см. Рисунок 23, соединение **114**), которое затем в индивидуальном виде было выделено с помощью колоночной хроматографии. С использованием методов ЯМР и РСА данный метаболит идентифицирован как новое  $5\alpha,22\alpha$ -дигидроксипроизводное гипсогеновой кислоты ( $3\beta,5\alpha,22\alpha$ -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовая кислота, Рисунок 52).

Наиболее информативным для определения структурных изменений ОК в процессе биотрансформации штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 стал  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр, который позволил выявить характерные сигналы трех атомов (76,50, 70,21 и 69,70 м.д.), связанных с третичной или вторичными гидроксильными группами, атомов двух карбоксильных групп (179,92 и 177,16 м.д.), а также сигналы атомов углерода двойной связи (143,53 и 121,46 м.д.) в структуре метаболита. В свою очередь, в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре зарегистрированы сигналы только шести метильных групп (1,20, 1,15, 1,02, 0,96, 0,92 и 0,75 м.д.), характерный сигнал олефинового протона в области 5,17 м.д., а также два сигнала протонов при гидроксильных группах: дублет дублетов с центром 3,79 м.д и мультиплет с центром 4,35 м.д. Окончательное отнесение структуры соединения **114** как нового  $5\alpha,22\alpha$ -дигидроксипроизводного гипсогеновой кислоты ( $3\beta,5\alpha,22\alpha$ -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовая кислота) выполнено с использованием метода РСА (Рисунок 53).

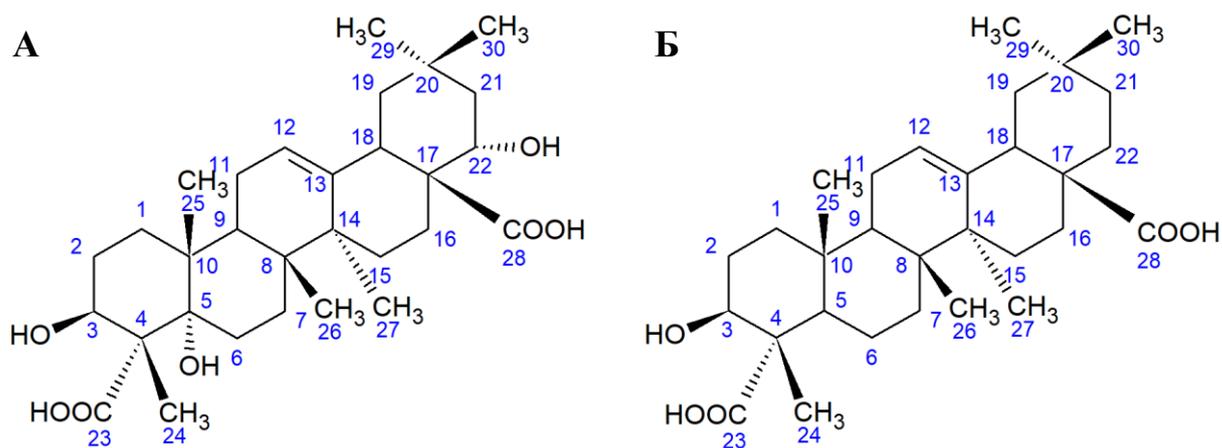


Рисунок 52 – Структурные формулы соединения **114** (А) и гипсогеновой кислоты (Б)

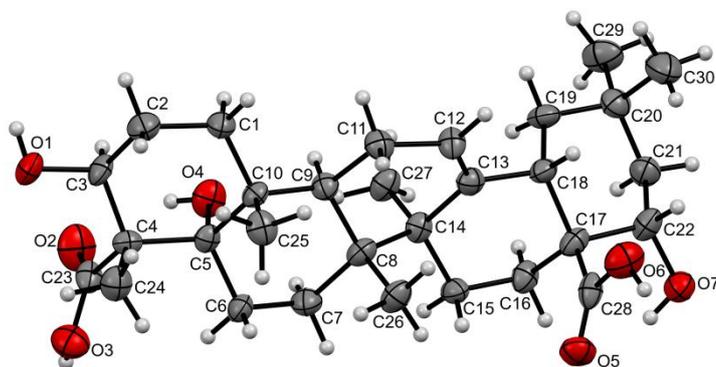


Рисунок 53 – Молекулярная структура соединения **114** в представлении неводородных атомов эллипсоидами тепловых колебаний с 30% вероятностью. Молекулы растворителей и воды не изображены

Необходимо отметить, что процесс C5 биогидроксилирования ОК с участием микроорганизмов обнаружен впервые. Хотя, подобная реакция была зарегистрирована ранее при биоконверсии трициклического дитерпеноида дегидроабиетиновой кислоты клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 267 (Cheremnykh *et al.*, 2018). Кроме того, впервые было зафиксировано карбоксилирование ОК при C23 атоме, что позволило выйти на производные гипсогеновой кислоты. Гипсогеновая кислота является редким природным тритерпеноидом, в малых количествах продуцируемым представителями растительных родов *Miconia* (Scalon Cunha *et al.*, 2007) и *Gypsophila* (Krasteva *et al.*, 2014), а также трансгенными дрожжами, экспрессирующими гены CYP450 (Fukushima *et al.*, 2013b). В то же время получение гипсогеновой кислоты и ее производных на

основе ОК представляется крайне перспективным. По литературным данным, гипсогеновая кислота проявляет цитотоксическую, антибактериальную и трипаноцидную активность (Cunha *et al.*, 2003; Scalon Cunha *et al.*, 2007; Krasteva *et al.*, 2014), которая может быть усилена путем введения дополнительных функциональных групп, в частности, гидроксильных.

Анализ фармакологического потенциала полученных производных включал исследование *in silico* экотоксичности и биоактивности, а также *in vitro* фитотоксического, антибактериального и цитотоксического действия.

С позиций зелёной фармацевтики при создании новых фармацевтических препаратов необходимо учитывать экологические риски их использования с тем, чтобы свести к минимуму нежелательные последствия от воздействия на природную среду (Daughton, Ruhoу, 2011). ECOSAR-анализ полученных производных показал, что, по сравнению с исходными соединениями, 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК могут обладать сниженной острой и хронической токсичностью (Таблицы 7, 8). Однако исходные кислоты и их 3-оксопроизводные потенциально характеризуются крайне низкой растворимостью в воде. При этом новое соединение **114** предположительно имеет значительно (более чем в 770 раз) повышенную растворимость в воде и сниженную токсичность в отношении водных организмов (Таблица 7).

При измерении длины корней семян овса посевного после обработки ОК, ГК и продуктами их биотрансформации и подсчете фитоэффекта не было выявлено статистически значимых различий, свидетельствующих о фитотоксичном эффекте исследуемых соединений (Рисунок 54).

**Таблица 7 – Прогнозируемая экотоксичность и растворимость ОК и ее производных**

Тест-объект (показатель, экспозиция)	Концентрация, мг/л		
	ОК	3-оксо-ОК	Соединение 114
Растворимость в воде при 25°C	0,0018	0,0016	1,391
ECOSAR класс	Нейтральные органические вещества – кислоты	Нейтральные органические вещества – кислоты	Нейтральные органические вещества – кислоты
<b>Острая токсичность</b>			
Рыбы (ЛД <sub>50</sub> , 96 ч)	0,018	0,052	192,78
Дафнии (ЛД <sub>50</sub> , 48 ч)	0,018	0,049	125,69
Зеленые водоросли (ЭД <sub>50</sub> , 96 ч)	0,127	0,286	165,80
<b>Хроническая токсичность</b>			
Рыбы (ЭД <sub>50</sub> , 30 сут)	0,003	0,009	22,18
Дафнии (ЭД <sub>50</sub> , 21 сут)	0,008	0,019	18,0
Зеленые водоросли (ЭД <sub>50</sub> , 16 сут)	0,112	0,227	59,07

Таблица 8 – Прогнозируемая экотоксичность и растворимость ГК и ее производного

Тест-объект (показатель, экспозиция)	Концентрация, мг/л	
	ГК	3-оксо-ГК
Растворимость в воде при 25°C	0,0023	0,0029
ECOSAR класс	Нейтральные органические вещества – кислоты	Винил/аллил кетоны – кислоты
Острая токсичность		
Рыбы (ЛД <sub>50</sub> , 96 ч)	0,171	4,624
Дафнии (ЛД <sub>50</sub> , 48 ч)	0,019	0,904
Зеленые водоросли (ЭД <sub>50</sub> , 96 ч)	0,035	1,166
Хроническая токсичность		
Рыбы (ЭД <sub>50</sub> , 30 сут)	0,004	0,260
Дафнии (ЭД <sub>50</sub> , 21 сут)	0,010	0,319
Зеленые водоросли (ЭД <sub>50</sub> , 16 сут)	0,131	1,976

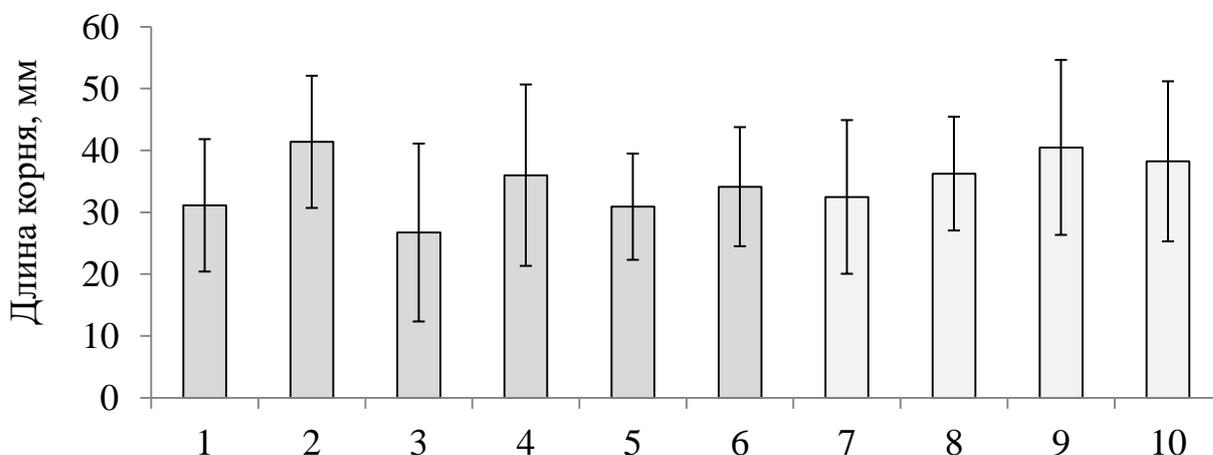


Рисунок 54 – Изменение длины корня овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием ОК, ГК и продуктов их трансформации: **1** – 1,0 г/л ОК, **2** – продукты биотрансформации ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, **3** – продукты биотрансформации ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, **4** – 1,0 г/л ГК, **5** – продукты биотрансформации ГК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, **6** – продукты биотрансформации ГК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, **7** – биотический контроль *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, **8** – биотический контроль *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, **9** – абиотический контроль (вода), **10** – контроль среды

Исследование предполагаемой биологической активности соединений на основе их структурных формул с помощью онлайн-сервиса PASS выявило, что 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК с высокой степенью вероятности (0,822 и 0,726 соответственно) могут выступать в качестве агониста апоптоза и антиоксидантного агента соответственно (Таблица 9).

Таблица 9 – Прогнозируемая биологическая активность ОК, ГК и их производных

Предполагаемая активность	ОК		3-оксо-ОК		ГК		3-оксо-ГК	
	P <sub>a</sub>	P <sub>i</sub>						
Агонист апоптоза	–	–	<b>0,822</b>	0,007	0,878	0,005	0,896	0,004
Стимулятор фактора 2, связанный с NF-E2	–	–	–	–	–	–	<b>0,726</b>	0,002
Противовирусная (грипп)	0,816	0,003	0,795	0,003	0,881	0,002	0,855	0,002
Ингибитор оксидоредуктазы	0,885	0,003	0,847	0,004	0,954	0,001	0,916	0,002
Стимулятор транскрипционного фактора NFκB	0,908	0,001	0,901	0,001	0,900	0,001	0,900	0,001
Противовоспалительная	0,714	0,014	0,734	0,012	0,850	0,005	0,866	0,005
Противоопухолевая	0,810	0,010	0,810	0,010	0,861	0,006	0,861	0,006
Гепатопротекторная	0,889	0,003	0,735	0,006	0,916	0,002	0,773	0,005

Оценка предполагаемой биоактивности нового соединения **114** показала, что данное вещество с высокой долей вероятности может обладать противоопухолевой, противовоспалительной, гепатопротекторной, обезбаливающей активностью, а также выступать в качестве промотора инсулина, стимулятора апоптоза и агента профилактики онкологических заболеваний (Таблица 10).

Таблица 10 – Прогнозируемая биологическая активность соединения 114

Предполагаемая активность	P <sub>a</sub>	P <sub>i</sub>
Стимулятор транскрипционного фактора NFκB	0,946	0,001
Промотор инсулина	0,906	0,003
Агонист апоптоза	0,908	0,004
Химиопрофилактическая	0,892	0,002
Гепатопротекторная	0,884	0,003
Противоопухолевая	0,823	0,009
Обезбаливающая	0,778	0,002

Ранее была показана ингибирующая активность нативных ОК и ГК в отношении патогенных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* (Duric *et al.*, 2013; Kannan *et al.*, 2019). Несмотря на то, что с использованием программы PASS Online нами не выявлен антимикробный потенциал полученных производных, экспериментальная оценка *in vitro* метаболитов ОК и ГК показала, что процессы окисления ОК способствуют повышению антибактериальной активности производных. Так, 3-оксо-ОК и 5 $\alpha$ ,22 $\alpha$ -дигидроксигипсогеновая кислота проявляли антибактериальную активность в отношении тест-культур (Таблица 11). Наибольшей резистентностью характеризовалась грамотрицательная *E. coli*, наибольшей чувствительностью – грамположительная *B. subtilis*. Необходимо отметить, что в связи с выявленной ингибирующей активностью соединений в отношении вегетативных клеток *B. subtilis* велика вероятность проявления ингибирующего действия производных и на прорастание их спор, которые играют ключевую роль в порче продуктов питания и наносят значительный ущерб пищевой промышленности (André *et al.*, 2017).

Таблица 11 – Антибактериальная активность (МПК, мг/мл) ОК, ГК и продуктов их биотрансформации

Соединение	Микроорганизм			
	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 196	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
ОК	12,5	>100	>100	12,5
3-оксо-ОК	3,125	12,5	50	0,098
Соединение <b>114</b>	0,781	1,563	0,781	0,781
ГК	>100	25	>100	0,195
3-оксо-ГК	>100	25	>100	50
Ампициллин	25	0,781	3,125	12,5
Канамицин	0,39	<0,024	<0,024	<0,024

В связи с известной противоопухолевой активностью ОК и гипсогеновой кислоты (Krasteva *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016), а также предполагаемой проапоптической и противоопухолевой активностью нового соединения **114**, документированной с использованием программы PASS Online, нами были проведены начальные эксперименты по определению цитотоксического эффекта данного метаболита. Однако выраженной цитотоксической активности соединения в отношении исследованных линий клеток рака молочной железы MCF7, MDA-MB-453, HBL-100 и его доксорубицин-устойчивого варианта HBL100/Dox не наблюдалось, а IC<sub>50</sub> в обоих случаях составляла более 100 мкМ. Известно, что тритерпеновые соединения обладают высокой селективностью в отношении определенных линий раковых клеток (Chudzik *et al.*, 2015), в связи с чем сохраняется вероятность обнаружения противоопухолевой активности полученного соединения **114** в отношении других клеточных линий. При этом необходимо отметить, что отсутствие цитотоксического эффекта производного в отношении клеток человека и выявленное антибактериальное действие свидетельствуют о перспективности его дальнейшего изучения.

## Глава 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНОЛОВОЙ И ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТ

На данный момент широко изучены основные ферментные системы, катализирующие превращения ОК и ГК в тканях растений (Fukushima *et al.*, 2011), тогда как сведения о микробных ферментах, ответственных за конверсию тритерпеноидов, немногочисленны и фрагментарны (Schmitz *et al.*, 2012). Известно, что в реакциях микробного окисления С3 атома стеролов, стероидов и тритерпеноидов может принимать участие холестеролоксидаза внеклеточной или мембранно-связанной формы (Bastos *et al.*, 2007). Однако в отличие от стеролов и стероидов, классических субстратов холестеролоксидазы, структура тритерпеноидов характеризуется наличием гем-диметильной группы при атоме С4 и транс-сочленением колец А и В. Скорее всего, данные факторы будут стерически препятствовать взаимодействию ОК и ГК с бифункциональной холестеролоксидазой, катализирующей параллельно изомеризацию двойной связи (Донова, 2007). В то же время в роли катализаторов окисления С3 группы могут выступать менее селективная 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа (Leipold *et al.*, 2010) и ферменты группы СУР450-зависимых оксигеназ (Fujii *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). При этом реакции гидроксирования и карбоксилирования, зафиксированные при конверсии ОК штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, как правило, катализируются ферментами семейства СУР450. Все вышеупомянутые ферменты, кроме внеклеточной формы холестеролоксидазы, локализуются преимущественно в цитоплазме или связаны с клеточной мембраной.

С использованием отдельных клеточных фракций нами экспериментально подтверждено участие в процессах биотрансформации ОК и ГК ферментов, связанных с клеточной мембраной (Таблицы 12, 13). При этом ферменты, экстрагируемые детергентом из клеточной мембраны, осуществляли частичную деградацию тритерпеноидов без образования каких-либо продуктов,

тогда как прочно связанные с клеточной стенкой ферментные системы катализировали конверсию ОК и ГК с образованием их окисленных производных. Полученные данные соотносятся с ранее полученными результатами по участию мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе биотрансформации родококками других растительных терпеноидов – бетулина и дегидроабетиновой кислоты (Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018).

Таблица 12 – Биотрансформация ОК и ГК с использованием клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360

Клеточная фракция	Содержание, %*	
	ОК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	68,76	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	94,05	3,95
	ГК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	96,8	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	48,4	51,6

Примечание: \*По данным ГХ-МС после 1 сут культивирования

Таблица 13 – Биотрансформация ОК и ГК с использованием клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 757

Клеточная фракция	Содержание, %*	
	ОК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	35,5	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	48,8	2,49
	ГК	Продукты трансформации
Супернатант с цитоплазматическими ферментами	100,0	0,0
Супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами	86,9	0,0
Ресуспендированный соникат клеток с неэкстрагированными ферментами	65,2	29,5

Примечание: \*По данным ГХ-МС после 1 сут культивирования

Полногеномное секвенирование штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 и последующий биоинформатический анализ полученных последовательностей позволили провести углубленное исследование их генетического потенциала. По данным онлайн-сервиса RAST, размер геномов штаммов-биотрансформаторов составлял 5,7 и 6,4 Мбр, а содержание GC было на уровне 67,8 и 67,6% соответственно (Таблица 14).

Таблица 14 – Свойства геномов *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757\*

Свойство	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757
Размер генома, bp	5731318	6403716
Содержание GC, %	67,8	67,6
N50	211699	203477
L50	9	11
Количество контигов	105	163
Количество кодирующих последовательностей	5545	6181
Количество РНК	55	54

Примечание. \*Согласно онлайн-сервису RAST

Среди всех кодирующих последовательностей в геномах *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 процентной соотношение генов с известной и неизвестной функцией составляло 22:78 и 23:77 соответственно. Распределение генов с известной функцией по категориям приведены на Рисунке 55.

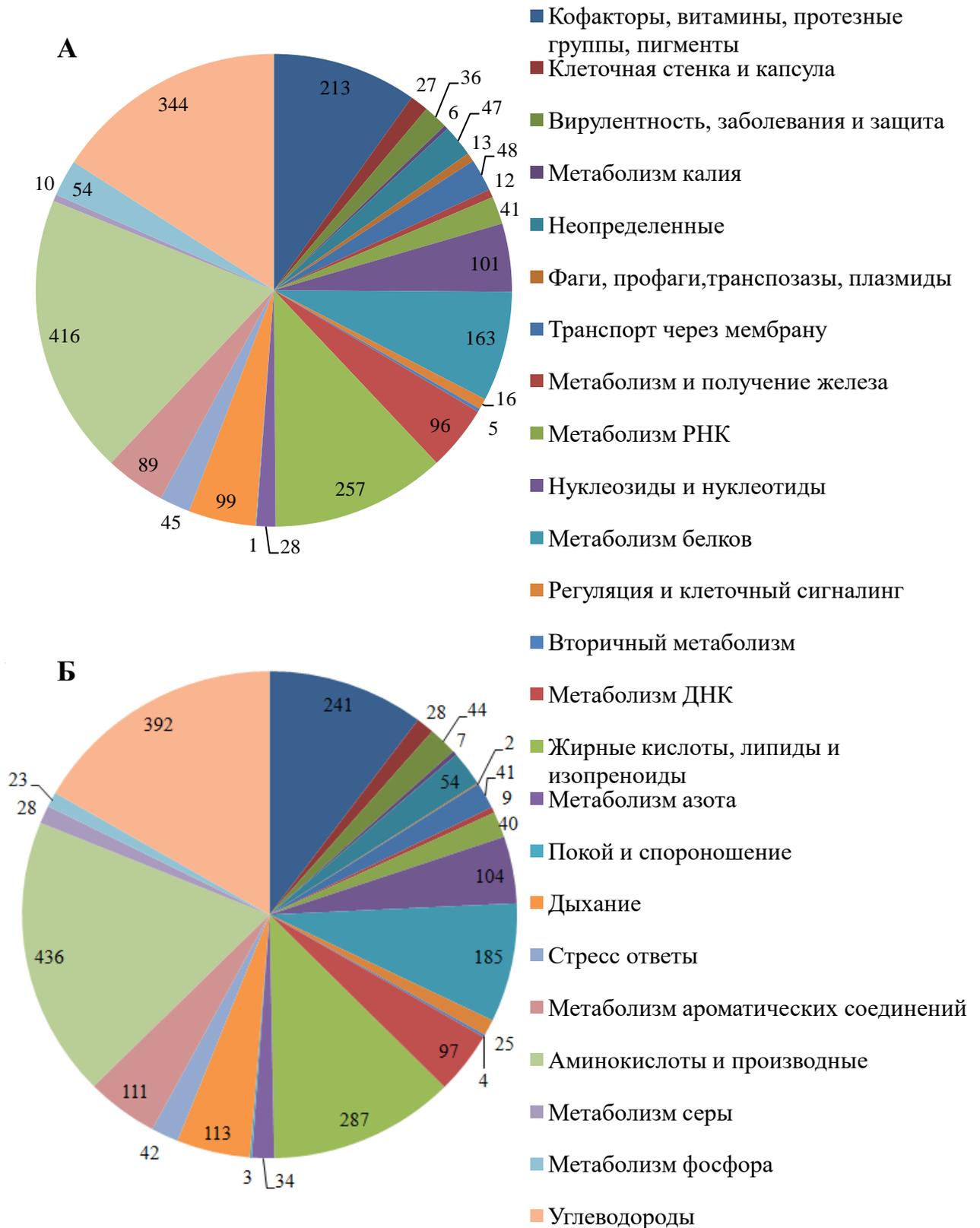


Рисунок 55 – Распределение генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (А) и ИЭГМ 757 (Б) по функциональным группам. Изображение получено с помощью SEED Viewer 2.0

Стоит отметить, что по результатам анализа метаболических путей в геномах обоих штаммов детектирован немевалонатный путь биосинтеза изопреноидов, включающий следующие ферменты: 1-дезоксид-*D*-ксилулозо-5-фосфатсинтаза (ЕС 2.2.1.7), 1-дезоксид-*D*-ксилулозо-5-фосфатредуктоизомераза (ЕС 1.1.1.267), 2-*C*-метил-*D*-эритритол-4-фосфатцитидилтрансфераза (ЕС 2.7.7.60), 4-дифосфоцитидил-2-*C*-метил-*D*-эритритолкиназа (ЕС 2.7.1.148), 2-*C*-метил-*D*-эритритол 2,4-циклодифосфатсинтаза (ЕС 4.6.1.12), 1-гидрокси-2-метил-2-(*E*)-бутенил-4-дифосфатсинтаза (ЕС 1.17.7.1), 4-гидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфатредуктаза (ЕС 1.17.1.2) (Рисунок 56) (Kuzuyama, 2002). В отличие от широко изученного классического мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов (см. Подглава 1.2), альтернативный немевалонатный путь был открыт лишь в конце XX века (Rohmer *et al.*, 1996) и по сей день активно исследуется. Согласно литературным данным, немевалонатный путь отсутствует у млекопитающих, но широко представлен в хлоропластах растений, водорослях, цианобактериях и эубактериях (Hunter, 2007). Данный путь обеспечивает образование изопентинил дифосфата (IPP) и диметилаллил дифосфата (DMAPP), необходимых для синтеза терпенов, стеролов, каротиноидов, долихолов. Особо следует отметить, что в настоящее время подавляющее большинство процессов биосинтеза терпеновых соединений в актиномицетах обнаружено и изучено в основном для представителей рода *Streptomyces*, тогда как для представителей рода *Rhodococcus* зарегистрированы лишь немногочисленные примеры биосинтеза зеатинов, изопреноидных цитокининов, имеющих диметилаллильный фрагмент, присоединенный к атому N аденина или аденозина (Helgeson, Leonard, 1966; Rudolf *et al.*, 2021), и ценных каротиноидов дигидроксинейроспорина, гидроксиэхиненона (Styczynski *et al.*, 2020),  $\beta$ -каротина, зеаксантина, изорениератина (Jiang *et al.*, 2023) и др. (Cappelletti *et al.*, 2020). В связи с тем, что использованные нами оба штамма родококков характеризуются красным цветом колоний, скорее всего, обнаруженный путь ответственен за синтез каротиноидов. Кроме того, с использованием онлайн-сервисов геномного майнинга AntiSMASH и PRISM

показано наличие в геноме обоих штаммов 2 биосинтетических генных кластеров синтеза каротиноида, предположительно изорениератина, а также биосинтетических генных кластеров синтеза поликетидов, нерибосомных пептид синтаз, гетеробактинов, бутиро- и  $\beta$ -лактонов. В случае *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 дополнительно обнаружен генный кластер синтеза  $\epsilon$ -поли-*L*-лизина.

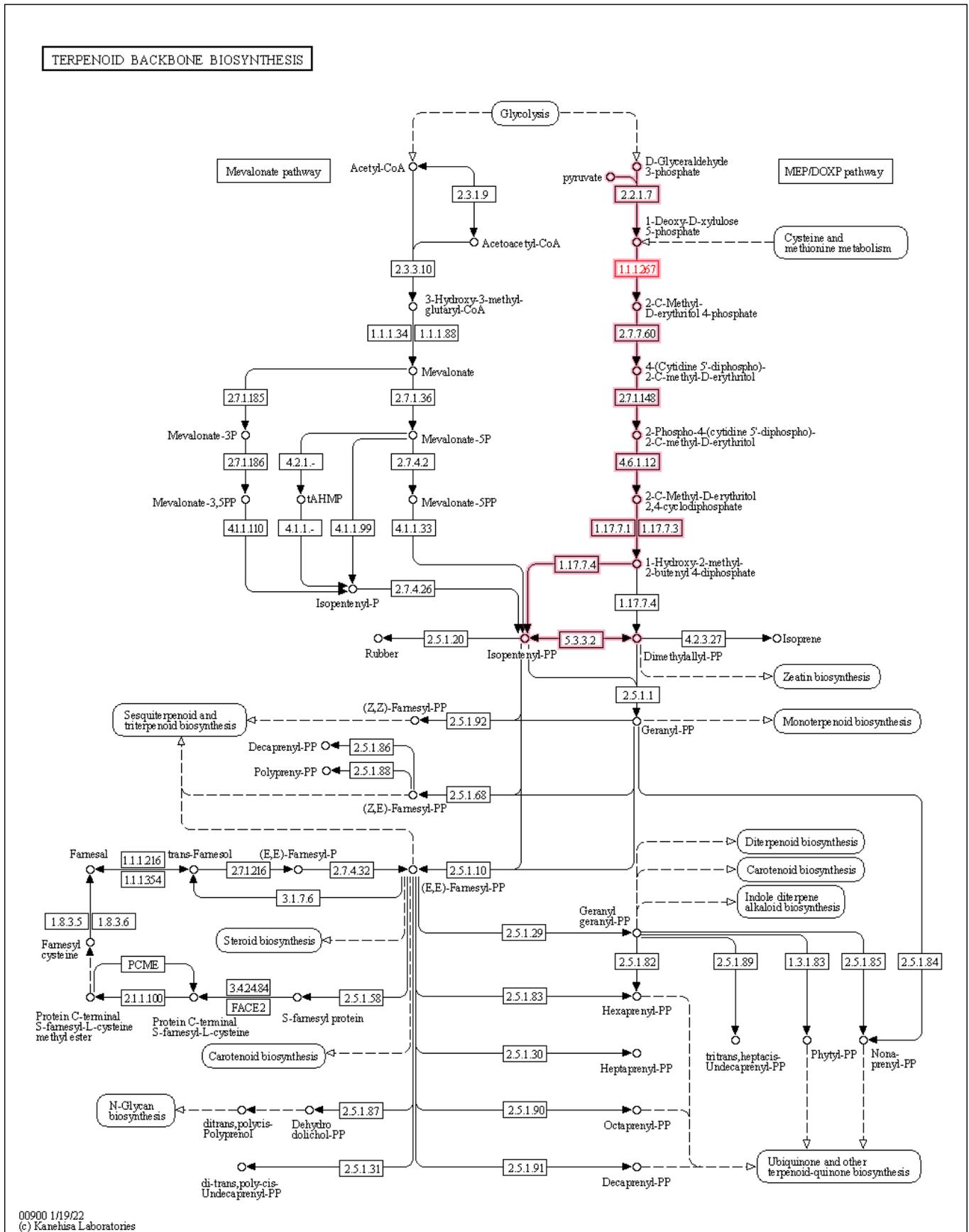


Рисунок 56 – Схема биосинтеза скелета терпеноидов. Розовым цветом отмечен бактериальный немевалонатный путь биосинтеза изопреноидов (<https://www.genome.jp/pathway/rn00900>)

Автоматическое аннотирование полученных последовательностей *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 в базе NCBI позволило осуществить поиск генов, кодирующих ферменты, предположительно участвующие в бактериальном окислении ОК и ГК. Нам удалось обнаружить 13 и 30 генов, кодирующих ферменты семейства цитохром P450 зависимых оксигеназ соответственно (Таблицы 15, 16).

Попарное сравнение генов CYP450 внутри каждого штамма в сервисе BLAST показало отсутствие значимых совпадений в режиме Megablast, что подтверждает, что все обнаруженные гены являются не копиями, а отдельными функциональными единицами.

Таблица 15 – Гены *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, кодирующие ферменты группы CYP450\*

№ п/п	ID гена (Номер контига)	Положение	Размер, п.н.
1	MCD2122195.1 (7)	156372..157625	1254
2	MCD2122488.1 (8)	c191430..192818	1389
3	MCD2122490.1 (8)	c193593..194780	1188
4	MCD2122492.1 (8)	c195502..196728	1227
5	MCD2122660.1 (9)	104195..105406	1212
6	MCD2122777.1 (10)	c33748..35127	1380
7	MCD2122881.1 (10)	c142155..143447	1293
8	MCD2122891.1 (10)	153479..154813	1335
9	MCD2123313.1 (13)	c96214..97560	1347
10	MCD2123648.1 (16)	6361..7593	1233
11	MCD2124057.1 (21)	c9490..10812	1323
12	MCD2124406.1 (26)	c36389..37753	1365
13	MCD2124666.1 (34)	c18217..20577	2361

\*По данным автоматического аннотирования в базе данных NCBI

Таблица 16 – Гены *R. rhodochrous* ИЭГМ 757, кодирующие ферменты группы СУР450\*

№ п/п	ID гена (Номер контига)	Положение	Размер, п.н.
1	MCD2110228.1 (2)	c175904..177292	1389
2	MCD2110230.1 (2)	c178067..179254	1188
3	MCD2110232.1 (2)	c179967..181193	1227
4	MCD2110413.1 (2)	c382010..383263	1254
5	MCD2110571.1 (2)	547960..549255	1296
6	MCD2111197.1 (4)	199296..200513	1218
7	MCD2111485.1 (5)	c47424..48707	1284
8	MCD2111502.1 (5)	c63058..64437	1380
9	MCD2111603.1 (5)	175155..176378	1214
10	MCD2111604.1 (5)	176468..177697	1230
11	MCD2111618.1 (5)	192090..193325	1236
12	MCD2111684.1 (5)	c256103..257449	1347
13	MCD2111707.1 (5)	c277043..278335	1293
14	MCD2111739.1 (5)	c307984..309330	1337
15	MCD2111762.1 (5)	334358..335692	1335
16	MCD2111873.1 (5)	c459464..>460666	1203
17	MCD2112909.1 (9)	c117094..118344	1251
18	MCD2113293.1 (11)	c76311..77486	1176
19	MCD2113487.1 (12)	c78090..79403	1314
20	MCD2113587.1 (12)	c190616..191827	1212
21	MCD2114161.1 (17)	c40856..42100	1245
22	MCD2114185.1 (17)	64958..66229	1272
23	MCD2114186.1 (17)	c66305..67549	1245
24	MCD2114191.1 (17)	c71586..72848	1263
25	MCD2114309.1 (19)	19116..20480	1365
26	MCD2114346.1 (20)	c1724..3109	1386

## Окончание таблицы 16

№ п/п	ИД гена (Номер контига)	Положение	Размер, п.н.
27	MCD2114626.1 (25)	с8950..10212	1263
28	MCD2114645.1 (25)	с30579..31841	1263
29	MCD2114721.1 (27)	27270..28601	1332
30	MCD2115052.1 (44)	4294..6654	2361

\*По данным автоматического аннотирования в базе данных NCBI

Попарное сравнение генов, кодирующих СУР450, из разных штаммов показало, что *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 имеют 2 и 18 уникальных генов соответственно (Таблица 17).

Таблица 17 – Сравнение последовательностей генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, кодирующих СУР450

№ п/п	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757		<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360		Процент сходства
	ID гена (Номер контига)	Расположение (Размер)	ID гена (Номер контига)	Расположение (Размер)	
1	MCD2110228.1 (2)	c175904..177292 (1389)	MCD2122488.1 (8)	c191430..192818 (1389)	96,04%
2	MCD2110230.1 (2)	c178067..179254 (1188)	MCD2122490.1 (8)	c193593..194780 (1188)	94,95%
3	MCD2110232.1 (2)	c179967..181193 (1227)	MCD2122492.1 (8)	c195502..196728 (1227)	94,38%
4	MCD2110413.1 (2)	c382010..383263 (1254)	MCD2122195.1 (7)	156372..157625 (1254)	98,17%
5	MCD2110571.1 (2)	547960..549255 (1296)			
6	MCD2111197.1 (4)	199296..200513 (1208)			
7	MCD2111485.1 (5)	c47424..48707 (1284)			
8	MCD2111502.1 (5)	c63058..64437 (1380)	MCD2122777.1 (10)	c33748..35127 (1380)	96,16%
9	MCD2111603.1 (5)	175155..176378 (1214)			
10	MCD2111604.1 (5)	176468..177697 (1210)			
11	MCD2111618.1 (5)	192090..193325 (1236)			
12	MCD2111684.1 (5)	c256103..257449 (1347)			
13	MCD2111707.1 (5)	c277043..278335 (1293)	MCD2122881.1 (10)	c142155..143447 (1293)	96,37%
14	MCD2111739.1 (5)	c307984..309330 (1337)			
15	MCD2111762.1 (5)	334358..335692 (1335)	MCD2122891.1 (10)	153479..154813 (1335)	95,73%
16	MCD2111873.1 (5)	c459464..>460666 (1203)	MCD2123313.1 (13)	c96214..97560 (1347)	95,84%
17	MCD2112909.1 (9)	c117094..118344 (1251)			

## Окончание таблицы 17

№ п/п	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757		<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360		Процент сходства
	ID гена (Номер контига)	Расположение (Размер)	ID гена (Номер контига)	Расположение (Размер)	
18	MCD2113293.1 (11)	c76311..77486 (1176)			
19	MCD2113487.1 (12)	c78090..79403 (1314)			
20	MCD2113587.1 (12)	c190616..191827 (1212)	MCD2122660.1 (9)	104195..105406 (1212)	96,20%
21	MCD2114161.1 (17)	c40856..42100 (1245)			
22	MCD2114185.1 (17)	64958..66229 (1272)			
23	MCD2114186.1 (17)	c66305..67549 (1245)			
24	MCD2114191.1 (17)	c71586..72848 (1263)			
25	MCD2114309.1 (19)	19116..20480 (1365)	MCD2124406.1 (26)	c36389..37753 (1365)	93,63%
26	MCD2114346.1 (20)	c1724..3109 (1386)	MCD2124406.1 (26)	c36419..37753 (1335)	82,70%
27	MCD2114626.1 (25)	c8950..10212 (1263)			
28	MCD2114645.1 (25)	c30579..31841 (1263)			
29	MCD2114721.1 (27)	27270..28601 (1332)			
30	MCD2115052.1 (44)	4294..6654 (2361)	MCD2124666.1 (34)	c18217..20577 (2361)	89,19%
31			MCD2124057.1 (21)	c9490..10812 (1323)	
32			MCD2123648.1 (16)	6361..7593 (1233)	

На основе обнаруженных последовательностей и их сравнительного анализа (см. Таблица 17) с использованием сервиса Primer-BLAST были подобраны пары праймеров для отдельных генов, с использованием ПЦР в реальном времени – оптимальные условия их амплификации (Таблица 18).

Таблица 18 – **Праймеры к генам, кодирующим ферменты СУР450\*** (нумерация генов совпадает с нумерацией в Таблице 17)

Направление	Последовательность (5'->3')	Температура отжига, °С		Размер продукта, п.н.
		ИЭГМ 1360	ИЭГМ 757	
Ген №1 (MCD2110228.1/MCD2122488.1)				
Прямой	ССТССТГАТТGGGGTСGATG	65	_**	393
Обратный	ТСАССGGCАТСТТСАТСТСГ			
Ген №2 (MCD2110230.1/MCD2122490.1)				
Прямой	GAGТТТСГТGGTGGTСТСГТ	63,3	–	400
Обратный	GGAACGCАТССТСГААСТГА			
Ген №3 (MCD2110232.1/MCD2122492.1)				
Прямой	GGTСТСГААСАТГАТССGСА	64,5	55,7	407
Обратный	TGТТСТТСГТССТGСТСГТС			
Ген №4 (MCD2110413.1/MCD2122195.1)				
Прямой	СGCGAGGACGАТГААГААГА	63,3	59	354
Обратный	GАССGТСГСТССААГАТГАТ			
Ген №5 (MCD2110571.1)				
Прямой	АТСGCСТГАТСГАСАССТТС	–	57	317
Обратный	АТСГАСГАССТСGGAGТАТ			
Ген №6 (MCD2111197.1)				
Прямой	АСССТGGGАТGGАСGТТСТА	–	57	351
Обратный	СТССАGAGCGАТАСGСАГТТ			
Ген №7 (MCD2111485.1)				
Прямой	AAGAGGAАТGТСGСAGGТСГ	–	61,4	407
Обратный	СТСАССССGAAАСGАСТGAA			
Ген №8 (MCD2111502.1/MCD2122777.1)				
Прямой	СGGGTGТТGССCGАГАТАТТ	–	63,3	304
Обратный	GGСТТТСАТСGАСТGТGTGC			
Ген №9 (MCD2111603.1)				
Прямой	СТСGGTGGТСААСGAAСТСА	–	61,4	351
Обратный	AGТТСТТСГТСGGТСАGСАG			
Ген №10 (MCD2111604.1)				
Прямой	ССGСТАСGАСGАГАТСТТСС	–	63,3	302
Обратный	AGСССАТСАAGСТСАGGAАС			
Ген №11 (MCD2111618.1)				
Прямой	АСААТGТТСАGСААСGСАСС	–	65	355
Обратный	TGAGCGAAСТССGAAАСGAA			
Ген №12 (MCD2111684.1)				
Прямой	САСАССGAGСАGТТСGАГАТ	–	65	225
Обратный	GТСGССАAGТGGAAСGТСТА			

## Продолжение таблицы 18

Направление	Последовательность (5'→3')	Температура отжига, °С		Размер продукта, п.н.
		ИЭГМ 1360	ИЭГМ 757	
Ген №13 (MCD2111707.1/MCD2122881.1)				
Прямой	CCCTCGATGAACTCCTGGTG	61,4	59	365
Обратный	CAGACCTTCTCGTTCGTGCAT			
Ген №14 (MCD2111739.1)				
Прямой	TTCTCGCGGATCTCGAACAG	–	–	447
Обратный	CTCCAACGACCACGACATCA			
Ген №15 (MCD2111762.1/MCD2122891.1)				
Прямой	GTGTTGTCGACCCATTCCGA	–	61,4	407
Обратный	AGCAGAGTCGCAAGAAAGGT			
Ген №16 (MCD2111873.1/MCD2123313.1)				
Прямой	CCCGAGATTGAGGAGAGTGC	61,4	65	370
Обратный	CGACGACATCTTCTCGGTGT			
Ген №17 (MCD2112909.1)				
Прямой	TCGGGGAGATCGACTTCTGT	–	–	346
Обратный	ACGGAAACCTCCACGACTTC			
Ген №18 (MCD2113293.1)				
Прямой	GGGATCAGGTAGCCGTCGAT	–	–	227
Обратный	GGGCACATCATCCACCAGTA			
Ген №19 (MCD2113487.1)				
Прямой	CTGATCACGGGTCAGGGTTC	–	63,3	535
Обратный	GGCCGATCCACACACCTATT			
Ген №20 (MCD2113587.1/MCD2122660.1)				
Прямой	GACCCGTAGGACAGCATCAC	–	64,5	273
Обратный	CGACTACATCTACCCGACGC			
Ген №21 (MCD2114161.1)				
Прямой	TTCCAATCGGCGAGATCGAG	–	57	404
Обратный	AAGGTGCGTCAAAACGAACG			
Ген №22 (MCD2114185.1)				
Прямой	CCTGCTACCGGATATTGCGT	–	61,4	378
Обратный	TGGGGAAACGACTCGTGAAG			
Ген №23 (MCD2114186.1)				
Прямой	CCTTGACGCGGATAGGTCTC	–	–	461
Обратный	GATCTGCTCATCTCCGGTGG			
Ген №24 (MCD2114191.1)				
Прямой	CGGTATCTTCTTCCACCCCG	–	63,3	347
Обратный	GGGTCTTCTCACCCACACAG			
Ген №25 (MCD2114309.1/MCD2124406.1)				
Прямой	CGACGTCTTCGAGATCAGCA	65	59	336
Обратный	GTCAGCCGGTTCATGTCAGA			
Ген №26 (MCD2114346.1/MCD2124406.1)				
Прямой	GCGAACTGACGACCGATACA	–	63,3	399
Обратный	CCTGCACTACTTGTGCTCA			

## Окончание таблицы 18

Направление	Последовательность (5'→3')	Температура отжига, °С		Размер продукта, п.н.
		ИЭГМ 1360	ИЭГМ 757	
Ген №27 (MCD2114626.1)				
Прямой	ATCTTTGAGCACCTCGGCAA	–	55	359
Обратный	GGCACTGGATCCCGACTATG			
Ген №28 (MCD2114645.1)				
Прямой	CATCACCATGTCTGCCCTTCT	–	59	294
Обратный	ATCCTGGCAAACACGGTCAT			
Ген №29 (MCD2114721.1)				
Прямой	CTCCAGTGATGCCCTTCTGGG	–	57	442
Обратный	TTCGATCGGGAGATGCTTGG			
Ген №30 (MCD2115052.1/MCD2124666.1)				
Прямой	AAGATGCGCAAGAATCCCGA	63,3	59	412
Обратный	TGTCACGCCGGATATCGAAG			
Ген №31 (MCD2124057.1)				
Прямой	CGGTAGACCCGGAATACGTG	57	–	313
Обратный	CGATCGTAATCGGACAGCCA			
Ген №32 (MCD2123648.1)				
Прямой	TGTTCTTGAGTCCACCGACG	61,4	–	298
Обратный	ACACAGGACTACACACTGCG			

Примечание. \*По данным сервиса Primer-BLAST. \*\*Ген не обнаружен в исследованных условиях.

Проведение ПЦР в реальном времени с подобранными праймерами позволили подтвердить наличие 10 и 24 из предполагаемых генов в геномах *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757 соответственно (Рисунки 57, 58). Полученные данные создают предпосылки для дальнейших генетических манипуляций и детального изучения транскриптомов штаммов-биотрансформаторов с целью обнаружения бактериальных ферментов биоконверсии ОК и ГК и кодирующих их функциональных генов.

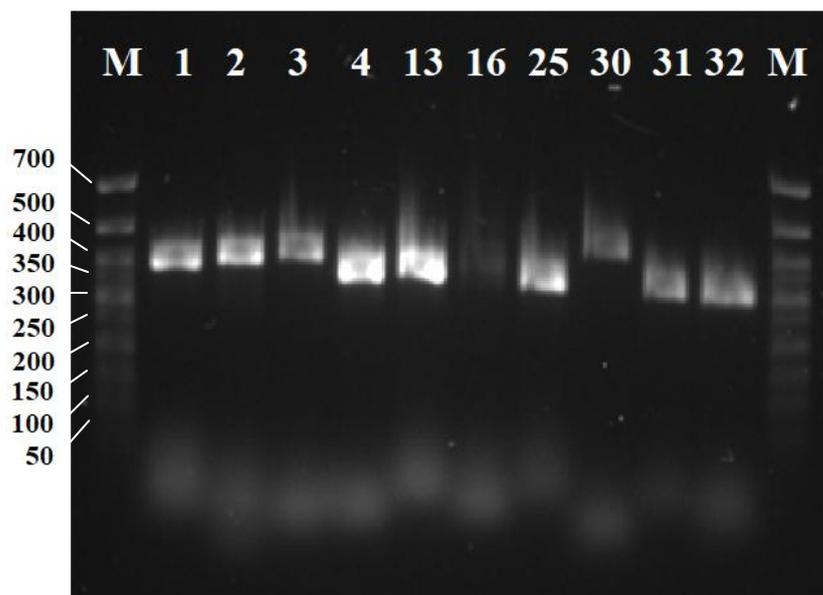


Рисунок 57 – Гель-электрофорез продуктов ПЦР в реальном времени *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 со специфическими праймерами к генам, кодирующим СУР450: М – маркер длин ДНК от 700 до 50 п.н. Номера генов совпадают с номерами генов в Таблице 18

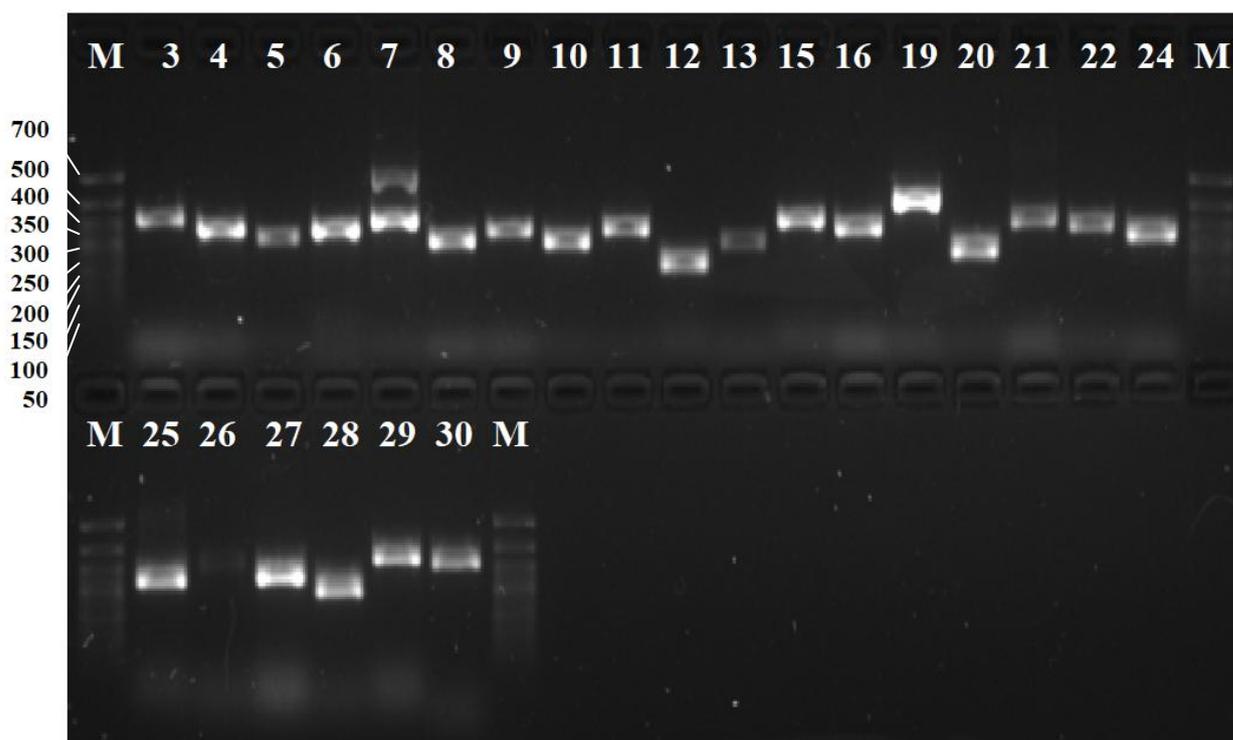


Рисунок 58 – Гель-электрофорез продуктов ПЦР в реальном времени *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 со специфическими праймерами к генам, кодирующим СУР450: М – маркер длин ДНК от 700 до 50 п.н. Номера генов совпадают с номерами генов в Таблице 18

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время остро стоит проблема дефицита лекарственных средств и снижения эффективности существующих методов лечения социально значимых заболеваний. Одним из активно развивающихся направлений в области медицинской химии является синтез новых фармакологически активных производных природных соединений. Так, лекарственные средства, полученные на основе вторичных растительных метаболитов, составляют около четверти мирового рынка фармацевтических препаратов (Newman, Cragg, 2020). Интерес исследователей к пентациклическим тритерпеноидам олеананового ряда обусловлен их широкой доступностью и спектром проявляемой противовирусной, противомикробной, противовоспалительной, противоопухолевой, гепатопротекторной, антидиабетической и др. активности (Li *et al.*, 2014; Isah *et al.*, 2016; Ayeleso *et al.*, 2017; Khwaza *et al.*, 2018). Следует отметить, что молекулы тритерпеноидов характеризуются повышенной степенью гидрофобности. Это значительно ограничивает их применение в качестве эффективных фармакологических агентов. В связи с этим актуален поиск новых производных с выраженной фармакологической активностью и повышенной биодоступностью. Для получения целевых соединений перспективно использование микроорганизмов, которое обусловлено их устойчивой активностью в экстремальных условиях внешней среды, исключительной хемо- и стереоселективностью, а также отсутствием проблемы минимизации побочных реакций и/или необходимости введения и снятия защитных групп (Shah *et al.*, 2014; Ivshina *et al.*, 2017; Cappelletti *et al.*, 2020). Одной из активно разрабатываемых групп в биотехнологии являются непатогенные актиномицеты, характеризующиеся способностью трансформировать сложные гидрофобные соединения.

На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <https://www.iegmcol.ru>) впервые установлена способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к биотрансформации пентациклических тритерпеноидов

олеананового ряда на примере олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 с наибольшей каталитической активностью в отношении данных тритерпеноидов в высокой (1,0 г/л) концентрации. По нашим данным, трансформация ГК с использованием нативных клеток протекала в течение 5 сут с образованием 3-оксо-ГК (54,2–57,4%). Ранее M.I. Choudhary с соавт. (2009) был описан процесс трансформации ГК в концентрации 0,4 г/л фитопатогенными мицелиальными грибами *Fusarium lini*. Однако широкое применение грибов в качестве биокатализаторов может быть ограничено спорным характером их роста и способностью к выработке микотоксинов. Способом *in vitro* авторами выявлена ингибирующая активность полученного производного в отношении липоксигеназ, катализирующих биосинтез продуктов, способствующих развитию воспалительных, аутоиммунных заболеваний, бронхиальной астмы и рака (Choudhary *et al.*, 2009). Ингибирующая активность 3-оксо-ГК показана также методом *in silico* в отношении протеазы M<sup>pro</sup> вируса SARS-CoV-2 (Florez, Singh, 2020).

Необходимо особо отметить, что процесс биотрансформации ОК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360 отличался образованием разных продуктов. Трансформация ОК с использованием нативных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 протекала в течение 5 сут с образованием 3-оксо-ОК (17,0%). Ранее В. Ludwig с соавт. (2015) был описан процесс трансформации ОК в концентрации 0,3 г/л актиномицетами *Nocardia iowensis* DSM 45197 (Ludwig *et al.*, 2015). Известно, что 3-оксо-ОК обладает выраженным противоопухолевым (Huang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011; Irungu *et al.*, 2014), антипаразитарным (Begum *et al.*, 2015; Funari *et al.*, 2016) и противовоспалительным (Giner-Larza *et al.*, 2001) действием. При использовании штамма ИЭГМ 757 нами зарегистрированы новые реакции С5 гидроксирования и С23 карбоксилирования молекулы ОК с образованием ранее неопisanного полиоксигенированного метаболита – 3β,5α,22α-тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5α,22α-дигидроксигипсогеновой)

кислоты (12,2%). Способом *in vitro* показана антибактериальная активность и отсутствие цитотоксического эффекта нового соединения, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения производного и его возможного применения в качестве антибактериального агента.

При исследовании механизмов взаимодействия родококков с тритерпеновыми кислотами задокументированы морфологические изменения в клетках, в частности их линейных размеров и рельефа клеточной поверхности, увеличение числа цитоплазматических полифосфатных и липидных включений, а также формирование многоклеточных агрегатов.

При определении оптимальных условий окислительной трансформации ОК и ГК подтверждена эффективность использования нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757, что позволило сократить продолжительность процесса с 5 до 1–3 сут и увеличить выход целевых продуктов до 60–100%. Показано, что взаимодействие нерастущих бактериальных клеток с ОК и ГК сопровождалось достоверным снижением соотношения площади поверхности клеток к их объему; накоплением внеклеточной липофильной жидкости (по нашему предположению, биосурфактанта); повышением шероховатости клеточной стенки. Это может способствовать усилению адгезии бактериальных клеток к субстрату и обеспечивать максимальный выход целевых продуктов.

Полногеномное секвенирование штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* позволило провести анализ генетического потенциала и выявить особенности катаболических процессов биотрансформации ОК и ГК. С применением методов биоинформатического анализа и последующей постановки ПЦР в реальном времени составлен Каталог генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 и ИЭГМ 1360, кодирующих ферменты семейства CYP450, которые участвуют в процессах окисления пентациклических тритерпеноидов. Полученные данные создают предпосылки для дальнейшего изучения транскриптомов штаммов-биотрансформаторов *R. rhodochrous* с целью

определения участвующих в процессе конверсии ОК и ГК ферментов и кодирующих их функциональных генов.

Полученные данные расширяют представление о биокаталитическом потенциале актиномицетов рода *Rhodococcus* и перспективах их использования в качестве эффективных катализаторов процессов биотрансформации для получения фармакологически активных соединений на основе растительных пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда.

## ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга большого числа (148) бактериальных штаммов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, [www.iegmc01.ru](http://www.iegmc01.ru)) впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда. Отобраны штаммы *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 и ИЭГМ 757, обладающие выраженной каталитической активностью в отношении олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот в высокой (1,0 г/л) концентрации и обеспечивающие селективное С3 окисление ОК и ГК, а также образование нового ранее неопisanного полиоксигенированного производного ОК.

2. С использованием методов электронной визуализации, электрофоретического рассеяния света и спектрофотометрии выявлены универсальные адаптационные приспособления, типичные для родококков в условиях контакта с тритерпеновыми кислотами: изменение морфометрических характеристик, перестройка поверхностных структур клетки, усиление гидрофобных взаимодействий между клетками, адгезия, переход от одиночного к агрегированному состоянию, синтез и аккумуляция энергетических веществ (липиды, полифосфаты).

3. Установлено, что использование суспензий нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (ОП<sub>600</sub> 2,6) и ИЭГМ 757 (ОП<sub>600</sub> 2,0) в слабощелочной среде (рН 8,0) способствует повышению выхода целевых производных ОК (до 61 и 90% соответственно) и сокращению процесса биотрансформации с 5 до 3 и 1 сут соответственно. Применение суспензий нерастаущих клеток обоих штаммов (ОП<sub>600</sub> 2,2) в слабокислых условиях (рН 6,0) обеспечивает наибольший (до 100%) выход 3-оксо-ГК в течение 3 сут.

4. Процесс биотрансформации ГК с участием обоих штаммов приводит к накоплению 3-оксо-ГК. Процесс трансформации ОК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 сопровождается образованием 3-оксо-ОК, трансформация ГК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ

757 протекает с образованием нового ранее неопisanного соединения  $3\beta,5\alpha,22\alpha$ -тригидрокси-олеан-12-ен-23,28-диовой ( $5\alpha,22\alpha$ -дигидроксигипсогеновой) кислоты. Способом *in vitro* выявлена антибактериальная активность 3-оксо-ОК и  $5\alpha,22\alpha$ -дигидроксигипсогеновой кислоты, *in silico* установлена пониженная токсичность метаболитов по сравнению с исходными кислотами и перспективность их применения в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов.

5. Экспериментально подтверждено участие мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе окислительной биотрансформации ОК и ГК. С использованием результатов NGS-секвенирования и последующей постановки ПЦР в реальном времени выявлены гены, кодирующие ферменты окислительной трансформации ОК и ГК, принадлежащие к семейству CYP450.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ-КЛСМ – атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГК – глицирретовая кислота

ГХ-МС – газовая хромато-масс спектрометрия

ЛД<sub>50</sub> – средняя летальная доза

МПБ – мясопептонный бульон

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ОК – олеаноловая кислота

ОП – оптическая плотность

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РСА – рентгеноструктурный анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УК – урсоловая кислота

ЭД<sub>50</sub> – средняя эффективная доза

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектрометрия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

CCDC – Cambridge Crystallographic Data Centre

CYP450 – cytochrome P450

ECOSAR – Ecological Structure Activity Relationships

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования

INT – йодонитротетразолия хлорид

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NGS – next generation sequencing

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances

*R.* – *Rhodococcus*

RAST – Rapid Annotation using Subsystem Technology

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бажутин Г.А., Ноговицина Е.М., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биотрансформирующая активность родококков в отношении насыщенных стероидов // Вестник Пермского Университета. Серия Биология. – 2015. – № 3. – С. 228–232.
2. Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Ившина И.Б. Бактериальная трансформация терпеноидов // Успехи химии. – 2014. – Т. 83, № 4. – С. 323–342.
3. Донова М.В. Трансформация стероидных соединений актинобактериями // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 1. – С. 5–18.
4. Иванова К.М., Гришко В.В., Ившина И.Б. Высокоэффективная биодеструкция экотоксичной дегидроабиетиновой кислоты нерастущими клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107 // Микробиология. – 2022. – Т. 91, № 4. – С. 419–432.
5. Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.07 / Ившина Ирина Борисовна. – Пермь, 1997. – 197 с.
6. Ившина И.Б. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов в России // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 551–560.
7. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углевородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография // Пермь: УрО РАН, 2021. – 140 с.
8. Мухутдинова А.Н. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида актинобактериями рода *Rhodococcus*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Мухутдинова Анна Наилевна. – Пермь, 2014. – 126 с.
9. Ноговицина Е.М., Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Получение стигмаст-4-ен-3-она из  $\beta$ -ситостерола с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus* // Вестник Пермского Университета. Серия Биология. – 2010. – № 1. – С. 64–68.

10. Alho D.P.S., Salvador J.A.R., Cascante M., Marin S. Synthesis and antiproliferative activity of novel heterocyclic glycyrrhetic acid derivatives // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Article 766.
11. Alvarado H.L., Abrego G., Garduño-Ramirez M.L., Clares B., García M.L., Calpena A.C. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa* // *Journal of Chromatography B*. – 2015. – Vol. 983–984. – P. 111–116.
12. Alvarez H.M., Mayer F., Fabritius D., Steinbüchel A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions // *Archives of Microbiology*. – 1996. – Vol. 165. – P. 377–386.
13. André S., Vallaeyts T., Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage // *Research in Microbiology*. – 2017. – Vol. 168, № 4. – P. 379–387.
14. Angelova B., Fernandes P., Cruz A., Pinheiro H.M., Mutafov S., Cabral J.M.S. Hydroxylation of androstenedione by resting *Rhodococcus* sp. cells in organic media // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2005. – Vol. 37, № 7. – P. 718–722.
15. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – Article 77.
16. Atrat P., Hosel P., Richter W., Meyer H.W., Horhold C. Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles // *Journal of Basic Microbiology*. – 1991. – Vol. 31, № 6. – P. 413–422.
17. Ayeleso T.B., Matumba M.G., Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 11. – Article 1915.
18. Ayub, A. Begum S., Ali S.T., Ali S.N., Siddiqui B.S. Triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* // *Journal of Asian Natural Products Research*. – 2019. – Vol. 21, № 20. – P. 141–149.
19. Bastos D.Z.L., Pimentel I.C., de Jesus D.A., de Oliveira B.H. Biotransformation of betulonic and betulonic acids by fungi // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68, № 6. – P. 834–839.
20. Begum S., Ayuba A., Siddiquia B.S., Fayyaz S., Kazi F. Nematicidal triterpenoids from *Lantana camara* // *Chemistry and Biodiversity*. – 2015. – Vol. 12, № 9. – P. 1435–1442.

21. Bell K.S., Philp J.C., Aw D.W.J., Christofi N. The genus *Rhodococcus* // Journal of Applied Microbiology. – 1998. – Vol. 85, № 2. – P. 195–210.
22. Beseda I., Czollner L., Shah P.S., Khunt R., Gaware R., Kosma P., Stanetty C., del Ruiz-Ruiz M.C., Amer H., Mereiter K., Da Cunha T., Odermatt A., Claßen-Houben D., Jordis U. Synthesis of glycyrrhetic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 18, № 1. – P. 433–454.
23. Blin K., Shaw S., Kloosterman A.M., Charlop-Powers Z., van Wezel G.P., Medema M.H., Weber T. AntiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49, № W1. – P. W29–W35.
24. Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason III J.A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – Article 8365.
25. Calixto J.B. The role of natural products in modern drug discovery // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. – 2019. – Vol. 91. – Article e20190105.
26. Capel C.S., de Souza A.C.D., de Carvalho T.C., de Sousa J.P.B., Ambrósio S.R., Martins C.H.G., Cunha W.R., Galán R.H., Furtado N.A.J.C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 38, № 9. – P. 1493–1498.
27. Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R.J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Vol. 104, № 20. – P. 8567–8594.
28. Carvalho F., Marques M.P.C., de Carvalho C.C.C.R., Cabral J.M.S., Fernandes P. Sitosterol bioconversion with resting cells in liquid polymer based systems // Bioresource Technology. – 2009. – Vol. 100, № 17. – P. 4050–4053.
29. Chen H.J., Kang S.P., Lee I.J., Lin Y.L. Glycyrrhetic acid suppressed NF- $\kappa$ B activation in TNF- $\alpha$ -induced hepatocytes // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, № 3. – P. 618–625.

30. Chen W., Kang S.P., Lee I.J., Lin Y.L. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3 // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2017. – Vol. 118. – P. 110–118.
31. Cheremnykh K.M., Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Bioconversion of ecotoxic dehydroabiatic acid using *Rhodococcus* actinobacteria // Journal of Hazardous Materials. – 2018. – Vol. 346. – P. 103–112.
32. Chouaïb K., Hichri F., Nguir A., Daami-Remadi M., Elie N., Touboul D., Jannet H.B., Hamza M.A. Semi-synthesis of new antimicrobial esters from the natural oleanolic and maslinic acids // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 183. – P. 8–17.
33. Choudhary A., Mittal A.K., Radhika M., Tripathy D., Chatterjee A., Banerjee U.C., Singh I.P. Two new stereoisomeric antioxidant triterpenes from *Potentilla fulgens* // Fitoterapia. – 2013. – Vol. 91. – P. 290–297.
34. Choudhary M.I., Siddiqui Z.A., Nawaz S.A. Microbial transformation of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid by *Cunninghamella elegans* and *Fusarium lini*, and lipoxygenase inhibitory activity of transformed products // Natural Product Research. – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 507–513.
35. Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I., Król W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds // Molecules. – 2015. – Vol. 20. – P. 1610–1625.
36. CrysAlisPro. Version 1.171.37.33 (release 27-03-2014 CrysAlis171.NET) // Agilent Technologies: Yarnton, UK, 2014.
37. Cunha W.R., Martins C., da Silva Ferreira D., Miller Crotti A.E., Lopes N.P., Albuquerque S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species // Planta Medica. – 2003. – Vol. 69, № 5. – P. 470–472.
38. Dai Z., Liu Y., Sun Z., Wang D., Qu G., Ma X., Fan F., Zhang L., Li S., Zhang X. Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2 $\alpha$  hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories // Metabolic Engineering. – 2019. – Vol. 51. – P. 70–78.
39. Dai Z., Wang B., Liu Y., Shi M., Wang D., Zhang X., Liu T., Huang L., Zhang X. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast // Scientific Reports. – 2014. – Vol. 4. – Article 3698.
40. Dale M.P., Moses T., Johnston E.J., Rosser S.J. A systematic comparison of triterpenoid biosynthetic enzymes for the production of oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15, № 5. – Article e0231980.

41. Daughton C.G., Ruhoy I.S. Green pharmacy and pharmEcovigilance: Prescribing and the planet // *Expert Review of Clinical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 4, № 2. – P. 211–232.
42. de Carvalho C.C.C.R., Costa S.S., Fernandes P., Couto I., Viveiros M. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol. 5. – Article 133.
43. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – Vol. 67, № 6. – P. 715–726.
44. de Sousa L.R.F., da Silva J.A., Cezar V.P., Costa M.B., dos Santos M.L., Sbardelotto A.B., do Ó Pessoa C., de Moraes M.O., Severo Menezes A.C. Constituintes químicos das cascas do caule de *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (*Vochysiaceae*) e avaliação das atividades citotóxica e inibitória frente as catepsinas B e K // *Química Nova*. – 2014. – Vol. 37, № 2. – P. 288–292.
45. Djerassi C., Henry J.A., Lemin A.J., Rios T., Thomas, G.H. Terpenoids. XXIV. The structure of the cactus triterpene queretaroic acid // *Journal of the American Chemical Society*. – 1956. – Vol. 78, № 15. – P. 3783–3787.
46. Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J., Howard J.A.K., Puschmann H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program // *Journal of Applied Crystallography*. – 2009. – Vol. 42, № 2. – P. 339–341.
47. Duetz W.A., Fjällman A.H.M., Ren S., Jourdat C., Witholt B. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67, № 6. – P. 2829–2832.
48. Duric K., Kovac-Besovic E., Niksic H., Sofic E. Antibacterial activity of methanolic extracts, decoction and isolated triterpene products from different parts of birch, *Betula pendula*, Roth // *Journal of Plant Studies*. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 61–70.
49. Elkin A.A., Kylosova T.I., Grishko V.V., Ivshina I.B. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2013. – Vol. 89. – P. 82–85.
50. Falev D.I., Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., Ovchinnikov D.V. Rapid simultaneous determination of pentacyclic triterpenoids by mixed-mode liquid

chromatography–tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography A. – 2020. – Vol. 1609. – Article 460458.

51. Fan B., Jiang B., Yan S., Xu B., Huang H., Chen G. Anti-inflammatory 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid derivatives produced by biocatalysis // *Planta Medica*. – 2019. – Vol. 85, № 1. – P. 56–61.

52. Feng J., Yi X., Huang W., Wang Y., He X. Novel triterpenoids and glycosides from durian exert pronounced anti-inflammatory activities // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 241. – P. 215–221.

53. Florez H., Singh S. Bioinformatic study to discover natural molecules with activity against COVID-19 // *F1000Research*. – 2020. – Vol. 9. – Article 1203.

54. Fu Q., Zhang L., Cheng N., Jia M., Zhang Y. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers // *Food and Bioproducts Processing*. – 2014. – Vol. 92, № 3. – P. 321–327.

55. Fu S., Meng Q., Yang J., Tu J., Sun D.A. Biocatalysis of ursolic acid by the fungus *Gliocladium roseum* CGMCC 3.3657 and resulting anti-HCV activity // *RSC Advances*. – 2018. – Vol. 8, № 29. – P. 16400–16405.

56. Fu S., Yang J., Cui J., Sun D.A. Biotransformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* CGMCC 3.2500 and anti-HCV activity // *Fitoterapia*. – 2013. – Vol. 86, № 1. – P. 123–128.

57. Fujii Y., Hirose S., Fujii T., Matsumoto N., Agematu H., Arisawa A. Hydroxylation of oleanolic acid to queretaroic acid by cytochrome P450 from *Nonomuraea recticatena* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2006. – Vol. 70, № 9. – P. 2299–2302.

58. Fukushima E.O., Seki H., Sawai S., Suzuki M., Ohyama K., Saito K., Muranaka T. Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast // *Plant and Cell Physiology*. – 2013. – Vol. 54, № 5. – P. 740–749.

59. Fukushima E.O., Seki H., Ohyama K., Ono E., Umemoto N., Mizutani M., Saito K., Muranaka T. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis // *Plant and Cell Physiology*. – 2011. – Vol. 52, № 12. – P. 2050–2061.

60. Funari C.S., de Almeida L., Passalacqua T.G., Martinez I., Ambrósio D.L., Cicarelli R.M.B., Silva D.H.S., Graminha M.A.S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (*Verbenaceae*) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity // *Acta Amazonica*. – 2016. – Vol. 46, № 4. – P. 411–416.

61. Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – Article 1886.
62. Giner-Larza E.M., Manez S., Recio M.C., Giner R.M., Prieto J.M., Cerda-Nicolas M., Ríos J.L. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity // *European Journal of Pharmacology*. – 2001. – Vol. 428, № 1. – P. 137–143.
63. Gong T., Zheng L., Zhen X., He H.X., Zhu H.X., Zhu P. Microbial transformation of oleanolic acid by *Trichothecium roseum* // *Journal of Asian Natural Products Research*. – 2014. – Vol. 16, № 4. – P. 383–386.
64. Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // *Process Biochemistry*. – 2013. – Vol. 48, № 11. – P. 1640–1644.
65. Grishko V.V., Galaiko N.V., Tolmacheva I.A., Kucherov I.I., Eremin V.F., Boreko E.I., Savinova O.V., Slepukhin P.A. Functionalization, cyclization and antiviral activity of A-secotriterpenoids // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 83. – P. 601–608.
66. Guinda Á., Rada M., Delgado T., Gutiérrez-Adánez P., Castellano J.M. Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58, № 17. – P. 9685–9691.
67. He C.J., Yang Y.M., Wu K.Y. Microbial transformation of glycyrrhetic acid by *Colletotrichum lini* AS 3.4486 // *Advanced Materials Research*. – 2015. – Vol. 1120–1121. – P. 877–881.
68. Helgeson J.P., Leonard N.J. Cytokinins: identification of compounds isolated from *Corynebacterium fascians* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1966. – Vol. 56, № 1. – P. 60–63.
69. Hernández M.A., Mohn W.W., Martínez E., Rost E., Alvarez A.F., Alvarez H.M. Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9. – Article 600.
70. Hill R.A., Connolly J.D. Triterpenoids // *Natural Product Reports*. – 2012. – Vol. 29, № 7. – P. 780–818.

71. Hodon J., Borkova L., Pokorny J., Kazakova A., Urban M. Design and synthesis of pentacyclic triterpene conjugates and their use in medicinal research // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 182. – Article 111653.
72. Huang D., Ding Y., Li Y., Zhang W., Fang W., Chen X. Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid // *Cancer Letters*. – 2006. – Vol. 233, № 2. – P. 289–296.
73. Huang F.X., Yang W., Ye F., Tian J., Hu H., Feng L., Guo D., Ye M. Microbial transformation of ursolic acid by *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schroter AS 3.264 // *Phytochemistry*. – 2012. – Vol. 82. – P. 56–60.
74. Huang L.R., Luo H., Yang X.S., Chen L., Zhang J.X., Wang D.P., Hao X.J. Enhancement of anti-bacterial and anti-tumor activities of pentacyclic triterpenes by introducing exocyclic  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone moiety in ring A // *Medicinal Chemistry Research*. – 2014. – Vol. 23, № 11. – P. 4631–4641.
75. Hunter, W.N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, № 30. – P. 21573–21577.
76. Huong N.T.N., Hung T., Dep T.T. A study on morphogenesis of roots of *Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K.M. Feng *in vitro* and preliminary determination of oleanolic acid in roots // *Vietnam Journal of Biotechnology*. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 49–54.
77. Irungu B.N., Orwa J.A., Gruhonjic A., Fitzpatrick P.A., Landberg G., Kimani F., Midiwo J., Erdélyi M., Yenesew A. Constituents of the roots and leaves of *Ekebergia capensis* and their potential antiplasmodial and cytotoxic activities // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19, № 9. – P. 14235–14246.
78. Isah M.B., Ibrahim M.A., Mohammed A., Aliyu A.B., Masola B., Coetzer T.H.T. A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases // *Parasitology*. – 2016. – Vol. 143, № 10. – P. 1219–1231.
79. Ishida T., Miki I., Tanahashi T., Yagi S., Kondo Y., Inoue J., Kawauchi S., Nishiumi S., Yoshida M., Maeda H., Tode C., Takeuchi A., Nakayama H., Azuma T., Mizuno S. Effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and hydroxypropyl  $\gamma$ cyclodextrin complex on indomethacin-induced small intestinal injury in mice // *European Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 714, № 1–3. – P. 125–131.

80. Ivshina I.B., Vikhareva E.V., Richkova M.I., Mukhutdinova A.N., Karpenko Ju.N. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28, № 10. – P. 2997–3006.
81. Ivshina I.B., Luchnikova N.A., Maltseva P.Yu., Ilyina I.V., Volcho K.P., Gatilov Y.V., Korchagina D.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Salakhutdinov N.F. Biotransformation of (–)-isopulegol by *Rhodococcus rhodochrous* // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15, № 8. – Article 964.
82. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – Article 9159.
83. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // Microbial Resources / I. Kurtboke ed. – Elsevier, 2017. – P. 121–148.
84. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1998. – Vol. 14, № 5. – P. 711–717.
85. Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Morisaki H., Nakajima M. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus* // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2003. – Vol. 30, № 1–2. – P. 51–60.
86. Jang S.-E., Jeong J.J., Hyam S.R., Han M.J., Kim D.-H. Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 on macrophages // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, № 40. – P. 9711–9721.
87. Jiang W., Sun J., Gao H., Tang Y., Wang C., Jiang Y., Zhang W., Xin F., Jiang M. Carotenoids production and genome analysis of a novel carotenoid producing *Rhodococcus aetherivorans* N1 // Enzyme and Microbial Technology. – 2023. – Vol. 164. – Article 110190.
88. Jing B., Liu M., Yang L., Cai H.-Y., Chen J.-B., Li Z.-X., Kou X., Wu Y.-Z., Qin D.-J., Zhou L., Jin J., Lei H., Xu H.-Z., Wang W.-W., Wu Y.-L. Characterization of naturally occurring pentacyclic triterpenes as novel inhibitors of deubiquitinating protease USP7 with anticancer activity *in vitro* // Acta Pharmacologica Sinica. – 2018. – Vol. 39, № 3. – P. 492–498.

89. Jyoti M.A., Zerín T., Kim T.-H., Hwang T.-S., Jang W.S., Nam K.-W., Song H.-Y. *In vitro* effect of ursolic acid on the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* and its cell wall mycolic acid // *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. – 2015. – Vol. 33. – P. 17–24.
90. Kalani K., Agarwal J., Alam S., Khan F., Pal A., Srivastava S.K. *In silico* and *in vivo* anti-malarial studies of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid from *Glycyrrhiza glabra* // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 9. – Article e74761.
91. Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // *Journal of Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 428, № 4. – P. 726–731.
92. Kang H., Ku S.-K., Kim J., Chung J., Kim S.C., Zhou W., Na M.K., Bae J.-S. Anti-vascular inflammatory effects of pentacyclic triterpenoids from *Astilbe rivularis* *in vitro* and *in vivo* // *Chemico-Biological Interactions*. – 2016. – Vol. 261. – P. 127–138.
93. Kannan S., Sathasivam G., Marudhamuthu M. Decrease of growth, biofilm and secreted virulence in opportunistic nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 by glycyrrhetic acid // *Microbial Pathogenesis*. – 2019. – Vol. 126. – P. 332–342.
94. Kawetripob W., Mahidol C., Prawat H., Ruchirawat S. Lupane, friedelane, oleanane, and ursane triterpenes from the stem of *Siphonodon celastrineus* Griff // *Phytochemistry*. – 2013. – Vol. 96. – P. 404–417.
95. Khwaza V., Oyedeji O.O., Aderibigbe B.A. Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 9. – Article 2300.
96. Kinoshita K., Yang Y., Koyama K., Takahashi K., Nishino H. Inhibitory effect of some triterpenes from cacti on <sup>32</sup>Pi-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate // *Phytomedicine*. – 1999. – Vol. 6, № 2. – P. 73–77.
97. Ko B.S., Jang J.S., Hong S.M., Sung S.R., Lee J.E., Lee M.Y., Jeon W.K., Park S. Changes in components, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, in raw *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, modify insulin sensitizing and insulinotropic actions // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 71, № 6. – P. 1452–1461.

98. Krasteva I., Yotova M., Yosifov D., Benbassat N., Jenett-Siems K., Konstantinov S. Cytotoxicity of gypsogenic acid isolated from *Gypsophila trichotoma* // Pharmacognosy Magazine. – 2014. – Vol. 10, № 38. – Article 430.
99. Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // Catalysts. – 2019. – Vol. 9, № 3. – Article 236.
100. Krivoruchko A., Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* // Current Opinion in Biotechnology. – 2015. – Vol. 35. – P. 7–15.
101. Kumar A., Choudhir G., Shukla S.K., Sharma M., Tyagi P., Bhushan A., Rathore M. Identification of phytochemical inhibitors against main protease of COVID-19 using molecular modeling approaches // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2020. – Vol. 39, № 10. – P. 3760–3770.
102. Kumar D., Dubey K.K. Hybrid approach for transformation for betulin (an anti-HIV molecule) // New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering / V. Gupta, A. Pandey eds. – Elsevier, 2019. – P. 193–203.
103. Kuyukina, M.S. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant / M.S. Kuyukina [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 65, № 3. – P. 596–603.
104. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties and potential applications // Biology of *Rhodococcus* / H.M. Alvarez ed. – Springer-Verlag, 2010. – P. 291–313.
105. Kuzuyama T. Biosynthetic studies on terpenoids produced by *Streptomyces* // The Journal of Antibiotics. – 2017. – Vol. 70, № 7. – P. 811–818.
106. Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2002. – Vol. 66, № 8. – P. 1619–1627.
107. Kylosova T.I., Elkin A.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of prochiral sulfides into (*R*)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – Vol. 123. – P. 8–13.
108. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: Biochemistry, physiology, and genetic adaptation // Advances in Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 59, № 6. – P. 1–29.

109. Lee J.Y., Choi J.K., Jeong N.-H., Yoo J., Ha Y.S., Lee B., Choi H., Park P.-H., Shin T.-Y., Kwong T.K., Lee S.-R., Lee S., Lee S.W., Rho M.-C., Kim S.-H. Anti-inflammatory effects of ursolic acid-3-acetate on human synovial fibroblasts and a murine model of rheumatoid arthritis // *International Immunopharmacology*. – 2017. – Vol. 49. – P. 118–125.
110. Leipold D., Wünsch G., Schmidt M., Bart H.-J., Bley T., H. Neuhaus E., Bergmann H., Richling E., Muffler K., Ulber R. Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp. strains-proposal of new biosynthetic pathways // *Process Biochemistry*. – 2010. – Vol. 45, № 7. – P. 1043–1051.
111. Lewin G.R., Carlos C., Chevrette M.G., Horn H.A., McDonald B.R., Stankey R.J., Fox B.G., Currie C.R. Evolution and ecology of *Actinobacteria* and their bioenergy applications // *Annual Review of Microbiology*. – 2016. – Vol. 70, № 1. – P. 235–254.
112. Li D., Wua Y., Wei P., Gao X., Li M., Zhang C., Zhou Z., Lu W. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for heterologous oleanolic acid production // *Chemical Engineering Science*. – 2020. – Vol. 218. – Article 115529.
113. Li H.H., Su M.-H., Yao D.-H., Zeng B.-Y., Chang Q., Wang W., Xu J. Anti-hepatocellular carcinoma activity of tormentic acid derived from suspension cells of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2017. – Vol. 130, № 2. – P. 427–433.
114. Li J., Lee Y.S., Choi J.-S., Sung H.-Y., Kim J.-K., Lim S.S., Kang Y.-H. Roasted licorice extracts dampen high glucose-induced mesangial hyperplasia and matrix deposition through blocking Akt activation and TGF- $\beta$  signaling // *Phytomedicine*. – 2010. – Vol. 17, № 10. – P. 800–810.
115. Li J.Y., Cao H., Liu P., Cheng G., Sun M. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: Literature review // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – Article 872139.
116. Li L., Wei L., Shen A., Chu J., Lin J., Peng J. Oleanolic acid modulates multiple intracellular targets to inhibit colorectal cancer growth // *International Journal of Oncology*. – 2015. – Vol. 47, № 6. – P. 2247–2254.
117. Liang C., Ding Y., Song S.B., Kim J.A., Cuong N.M., Ma J.Y., Kim Y.H. Oleanane-triterpenoids from *Panax stipuleanatus* inhibit NF- $\kappa$ B // *Journal of Ginseng Research*. – 2013. – Vol. 37, № 1. – P. 74–79.

118. Liang S., Li M., Yu X., Jin H., Zhang Y., Zhang L., Zhou D., Xiao S. Synthesis and structure-activity relationship studies of water-soluble  $\beta$ -cyclodextrin-glycyrrhetic acid conjugates as potential anti-influenza virus agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 166. – P. 328–338.
119. Lu C., Zhang C., Zhao F., Li D., Lu W. Biosynthesis of ursolic acid and oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae* // *AIChE Journal*. – 2018. – Vol. 64, № 11. – P. 3794–3802.
120. Lu M.Y., Liao Z., Ji L., Sun H. Triterpenoids of *Chrysosplenium carnosum* // *Fitoterapia*. – 2013. – Vol. 85, № 1. – P. 119–124.
121. Ludwig B., Geib D., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Muffler K., Ulber R. Whole-cell biotransformation of oleanolic acid by free and immobilized cells of *Nocardia iowensis*: Characterization of new metabolites // *Engineering in Life Sciences*. – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 108–115.
122. Ma C., Nakamura N., Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization // *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. – 2002. – Vol. 48, № 11. – P. 1681–1688.
123. Ma Y., Liu J.-M., Chen R.-D., An X.-Q., Dai J.-G. Microbial transformation of glycyrrhetic acid and potent neural anti-inflammatory activity of the metabolites // *Chinese Chemical Letters*. – 2017. – Vol. 28, № 6. – P. 1200–1204.
124. Maatooq G.T., Marzouk A.M., Gray A.I., Rosazza J.P. Bioactive microbial metabolites from glycyrrhetic acid // *Phytochemistry*. – 2010. – Vol. 71. – P. 262–270.
125. Maldonado E., Amador S., Juárez-Jaimes V. Secondary metabolites from *Asclepias otarioides* // *Journal of the Mexican Chemical Society*. – 2015. – Vol. 59, № 1. – P. 50–52.
126. Martinez A., Rivas F., Perojil A., Parra A., Garcia-Granados A., Fernandez-Vivas A. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei* // *Phytochemistry*. – 2013. – Vol. 94. – P. 229–237.
127. Martinez A., Perojil A., Rivas F., Parra A., Garcia-Granados A., Fernandez-Vivas A. Biotransformation of oleanolic and maslinic methyl esters by *Rhizomucor miehei* CECT 2749 // *Phytochemistry*. – 2015. – Vol. 117. – P. 500–508.
128. Mendes V.I.S., Bartholomeusz G.A., Ayres M., Gandhi V., Salvador J.A.R. Synthesis and cytotoxic activity of novel A-ring cleaved ursolic acid

derivatives in human non-small cell lung cancer cells // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 123. – P. 317–331.

129. Mlala S., Oyedeji A.O., Gondwe M., Oyedeji O.O. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 15. – Article 2751.

130. Mohn W.W., Wilson A.E., Bicho P., Moore E.R. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1999. – Vol. 22, № 1. – P. 68–78.

131. Moldoveanu S.C., Scott W.A. Analysis of four pentacyclic triterpenoid acids in several bioactive botanicals with gas and liquid chromatography and mass spectrometry detection // *Journal of Separation Science*. – 2016. – Vol. 39, № 2. – P. 324–332.

132. Moses T., Pollier J., Almagro L., Buyst D., Van Montagu M., Pedreño M.A., Martins J.C., Thevelein J.M., Goossens A. Combinatorial biosynthesis of saponins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 $\alpha$  hydroxylase from *Bupleurum falcatum* // *PNAS*. – 2014a. – Vol. 111, № 4. – P. 1634–1639.

133. Moses T., Thevelein J.M., Goossens A., Pollier J. Comparative analysis of CYP93E proteins for improved microbial synthesis of plant triterpenoids // *Phytochemistry*. – 2014b. – Vol. 108. – P. 47–56.

134. Mosquera C., Panay A.J., Montoya G. Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* can function as inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 6. – Article 1444.

135. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.

136. Mrunalini B.R., Girisha S.T. Screening and characterization of lipid inclusions in bacteria by fluorescence microscopy and mass spectrometry as a source for biofuel production // *Indian Journal of Science and Technology*. – 2017. – Vol. 10, № 21. – P. 1–7.

137. Nawawi N.M., Ahmad S.A., Maniyam M.N., Ibrahim A.L. Biotransformation of phenol by the resting cells of *Rhodococcus* sp. NAM 81 // *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 101–107.

138. Neumann G., Veeranagouda Y., Karegoudar T.B., Sahin Ö., Mäusezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Heipieper H.J. Cells of *Pseudomonas putida* and

*Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9, № 2. – P. 163–168.

139. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 // *Journal of Natural Products*. – 2020. – Vol. 83, № 3. – P. 770–803.

140. Oancea I.A., van Staden J.(K.)F., Oancea E., Ungureanu E.M. Electrochemical detection of ursolic acid from spruce (*Picea abies*) essential oils using modified amperometric microsensors // *Analytical Letters*. – 2019. – Vol. 52, № 14. – P. 2214–2226.

141. Parida P.K., Sau A., Ghosh T., Jana K., Biswas K. Raha S., Anup Misra K. Synthesis and evaluation of triazole linked glycosylated 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid derivatives as anticancer agents // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – Vol. 24, № 16. – P. 3865–3868.

142. Parikh S.J., Mukome F.N.D., Zhang X. ATR–FTIR spectroscopic evidence for biomolecular phosphorus and carboxyl groups facilitating bacterial adhesion to iron oxides // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2014. – Vol. 119. – P. 38–46.

143. Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 53. – Article 107698.

144. Pensec F., Pączkowski C., Grabarczyk M., Woźniak A., Bénard-Gellon M., Bertsch C., Chong J., Szakiel A. Changes in the triterpenoid content of cuticular waxes during fruit ripening of eight grape (*Vitis vinifera*) cultivars grown in the upper rhine valley // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 62, № 32. – P. 7998–8007.

145. Peragon, J. Time course of pentacyclic triterpenoids from fruits and leaves of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. Picual and cv. Cornezuelo during ripening // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61. – P. 6671–6678.

146. Postgate, J.R. Differential media for sulphur bacteria // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1959. – Vol. 10, № 12. – P. 669–674.

147. Presentato A., Cappelletti M., Sansone A., Ferreri C., Piacenza E., Demeter M.A., Crognale S., Petruccioli M., Milazzo G., Fedi S., Steinbüchel A., Turner R.J., Zannoni D. Aerobic growth of *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 using selected naphthenic acids as the sole carbon and energy sources // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – Article 672.

148. Qin Y.J., Feng B., Song X.-B., Zhou W.-B., Yu H.-S., Zhao L.-L., Yu L.-Y., Ma B.-P. Biotransformation of glycyrrhetic acid by *Cunninghamella blakesleeana* // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2010. – Vol. 8, № 5. – P. 373–381.
149. Ren Y., Kinghorn A.D. Natural product triterpenoids and their semi-synthetic derivatives with potential anticancer activity // Planta Medica. – 2019. – Vol. 85, № 11–12. – P. 802–814.
150. Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahn H. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – Vol. 118. – P. 2564–2566.
151. Romero C., García A., Medina E., Ruíz-Méndez M.V., de Castro A., Brenes M. Triterpenic acids in table olives // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 118, № 3. – P. 670–674.
152. Rudolf J.D., Alsup T., Xu B., Li Z. Bacterial terpenome // Natural Product Reports. – 2021. – Vol. 38, № 5. – P. 905–980.
153. Sampangi-Ramaiah M.H., Vishwakarma R., Shaanker R.U. Molecular docking analysis of selected natural products from plants for inhibition of SARS-CoV-2 main protease // Current Science. – 2020. – Vol. 118, № 7. – P. 1087–1092.
154. Scalon Cunha L.C., Andrade e Silva M.L., Cardoso Furtado N.A.J., Vinhólis A.H.C., Gomes Martins C.H., da Silva Filho A.A., Cunha W.R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens // Zeitschrift fur Naturforschung – Section C Journal of Biosciences. – 2007. – Vol. 62, № 9–10. – P. 668–672.
155. Schmitz D., Janocha S., Kiss F.M., Bernhardt R. CYP106A2—A versatile biocatalyst with high potential for biotechnological production of selectively hydroxylated steroid and terpenoid compounds // Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics. – 2018. – Vol. 1866, № 1. – P. 11–22.
156. Schmitz D., Zapp J., Bernhardt R. Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium* // FEBS Journal. – 2012. – Vol. 279. – P. 1663–1674.
157. Shah S.A.A., Tan H.L., Sultan S., Faridz M.A.B.M., Shah M.A.B.M., Nurfazilah S., Hussain M. Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional

triterpenoids derived from phytonutrients // International Journal of Molecular Sciences. – 2014. – Vol. 15, № 7. – P. 12027–12060.

158. Shan J., Xuan Y., Zhang Q., Zhu C., Liu Z., Zhang S. Ursolic acid synergistically enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer // Protein and Cell. – 2016. – Vol. 7, № 8. – P. 571–585.

159. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX // Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography. – 2008. – Vol. 64, № 1. – P. 112–122.

160. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. – 2015. – Vol. 71. – P. 3–8.

161. Shi Y., Song Q., Hu D., Zhuang X., Yu S., Teng D. Oleanolic acid induced autophagic cell death in hepatocellular carcinoma cells *via* PI3K/Akt/mTOR and ROS-dependent pathway // The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. – 2016. – Vol. 20, № 3. – P. 237–243.

162. Skinnider M.A., Johnston C.W., Gunabalasingam M., Merwin N.J., Kieliszek A.M., MacLellan R.J., Li H., Ranieri M.R.M., Webster A.L.H., Cao M.P.T., Pfeifle A., Spencer N., To Q.H., Wallace D.P., Dejong C.A., Magarvey N.A. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 1–9.

163. Song N.Y., Cho J.-G., Im D., Lee D.-Y., Wu Q., Seo W.-D., Kang H.C., Lee Y.-H., Baek N.-I. Triterpenoids from *Fragaria ananassa* calyx and their inhibitory effects on melanogenesis in B16-F10 mouse melanoma cells // Natural Product Research. – 2013. – Vol. 27, № 23. – P. 2219–2223.

164. Spek, A.L. PLATON SQUEEZE: A tool for the calculation of the disordered solvent contribution to the calculated structure factors // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. – 2015. – Vol. 71. – P. 9–18.

165. Styczynski M., Rogowska A., Szakiel A., Dziewit L., Gieczewska K., Garstka M. Genome-based insights into the production of carotenoids by antarctic bacteria, *Planococcus* sp. ANT\_H30 and *Rhodococcus* sp. ANT\_H53B // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 19. – Article 4357.

166. Su X., Sun F., Wang Y., Hashmi M.Z., Guo L., Ding L., Shen C. Identification, characterization and molecular analysis of the viable but nonculturable *Rhodococcus biphenylivorans* // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5, № 1. – Article 18590.

167. Sun H., Liu T., Shen Y.-J., Zhang L.-M., Wang M Preparation and crystal structure of 15 $\alpha$ -hydroxyl-oleanolic acid // *Jiegou Huaxue*. – 2010. – Vol. 29, № 12. – P. 1789–1801.
168. Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // *Process Biochemistry*. – 2017. – Vol. 52. – P. 1–9.
169. Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A. Triterpene biosynthesis in plants // *Annual Review of Plant Biology*. – 2014. – Vol. 65, № 1. – P. 225–257.
170. Thompson M.L., Marriott R., Dowle A., Grogan G. Biotransformation of beta-myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 85, № 3. – P. 721–730.
171. Tohmé M.J., Giménez M.C., Peralta A., Colombo M.I., Delgui L.R. Ursolic acid: A novel antiviral compound inhibiting rotavirus infection *in vitro* // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2019. – Vol. 54, № 5. – P. 601–609.
172. Uzoечи S.C., Abu-Lail N.I. The effects of  $\beta$ -lactam antibiotics on surface modifications of multidrug-resistant *Escherichia coli*: A multiscale approach // *Microscopy and Microanalysis*. – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 135–150.
173. van Bergeijk D.A., Terlouw B.R., Medema M.H., van Wezel G.P. Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – Vol. 18, № 10. – P. 546–558.
174. Van Beilen J.B., Holtackers R., Lüscher D., Bauer U., Witholt B., Duetz W.A. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 71, № 4. – P. 1737–1744.
175. Villar V.H., Vögler O., Barceló F., Gómez-Florit M., Martínez-Serra J., Obrador-Hevia A., Martín-Broto J., Ruiz-Gutiérrez V., Alemany R. Oleanolic and maslinic acid sensitize soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the multidrug resistance protein MRP-1, but not P-glycoprotein // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 429–438.
176. Wang C.M., Chen H.-T., Li T.-C., Weng J.-H., Jhan Y.-L., Lin S.-X., Chou C.-H. The role of pentacyclic triterpenoids in the allelopathic effects of

*Alstonia scholaris* // Journal of Chemical Ecology. – 2014. – Vol. 40, № 1. – P. 90–98.

177. Wang T., Flint S., Palmer J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation // Biofouling. – 2019. – Vol. 35, № 9. – P. 959–974.

178. Wang Z.W., Wang J.-S., Luo J., Kong L.-Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata* // Fitoterapia. – 2013. – Vol. 90. – P. 30–37.

179. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // Nature Protocols. – 2008. – Vol. 3. – P. 163–175.

180. Wiemann J., Heller L., Csuk R. Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2016. – Vol. 26, № 3. – P. 907–909.

181. Woźniak Ł., Skąpska S., Marszałek K. Ursolic acid – a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities // Molecules. – 2015. – Vol. 20, № 11. – P. 20614–20641.

182. Wu H., Li G., Liu S., Liu D., Chen G., Hu N., Suo Y., You J. Simultaneous determination of six triterpenic acids in some Chinese medicinal herbs using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2015. – Vol. 107. – P. 98–107.

183. Wu P.P., Zhang B.-J., Cui X.-P., Yang Y., Jiang Z.-Y., Zhou Z.-H., Zhong Y.-Y., Mai Y.-Y., Ouyang Z., Chen H.-S., Zheng J., Zhao S.-Q., Zhang K. Synthesis and biological evaluation of novel ursolic acid analogues as potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitors // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Article 45578.

184. Wu S.B., Bao Q.-Y., Wang W.-X., Zhao Y., Xia G., Zhao Z., Zeng H., Hu J.-F. Cytotoxic triterpenoids and steroids from the bark of *Melia azedarach* // Planta Medica. – 2011. – Vol. 77, № 9. – P. 922–928.

185. Wu S.Y., Cui S., Wang L., Zhang Y., Yan X., Lu H., Xing G., Ren J., Gong L.  $18\beta$ -Glycyrrhetic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway // Acta Pharmacologica Sinica. – 2018. – Vol. 39, № 12. – P. 1865–1873.

186. Wu X.D., He J., Li X.-Y., Dong L.-B., Gong X., Gao X., Song L.-D., Li Y., Peng L.-Y., Zhao Q.-S. Triterpenoids and steroids with cytotoxic activity from *Emmenopterys henryi* // *Planta Medica*. – 2013. – Vol. 79, № 14. – P. 1356–1361.
187. Xu B., Wu G.-R., Zhang X.-Y., Yan M.-M., Zhao R., Xue N.-N., Fang K., Wang H., Chen M., Guo W.-B., Wang P.-L., Lei H.-M. An overview of structurally modified glycyrrhetic acid derivatives as antitumor agents // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 6. – Article 924.
188. Xu S.H., Chen H., Fan Y., Xu W., Zhang J. Application of tandem biotransformation for biosynthesis of new pentacyclic triterpenoid derivatives with neuroprotective effect // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 30, № 4. – Article 126947.
189. Xu S.H., Zhang C., Wang W.-W., Yu B.-Y., Zhang J. Site-selective biotransformation of ursane triterpenes by *Streptomyces griseus* ATCC 13273 // *RSC Advances*. – 2017a. – Vol. 7, № 34. – P. 20754–20759.
190. Xu S.H., Wang W.-W., Zhang C., Liu X.-F., Yu B.-Y., Zhang J. Site-selective oxidation of unactivated C–H sp<sup>3</sup> bonds of oleanane triterpenes by *Streptomyces griseus* ATCC 13273 // *Tetrahedron*. – 2017b. – Vol. 73, № 21. – P. 3086–3092.
191. Xu Y.Q., Zhang J.H., Yang X.S. Corosolic acid induces potent anti-cancer effects in CaSki cervical cancer cells through the induction of apoptosis, cell cycle arrest and PI3K/Akt signalling pathway // *Bangladesh Journal of Pharmacology*. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 453–459.
192. Yamamoto E.S., Campos B.L.S., Laurenti M.D., Lago J.H.G., dos Santos Grecco S., Corbett C.E.P., Passero L.F.D. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice // *Parasitology Research*. – 2014. – Vol. 113, № 1. – P. 333–339.
193. Yan M., Zhu Y., Zhang H.-J., Jiao W.-H., Han B.-N., Liu Z.-X., Qiu F., Chen W.-S., Lin H.-W. Anti-inflammatory secondary metabolites from the leaves of *Rosa laevigata* // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 21, № 11. – P. 3290–3297.
194. Yan S., Lin H., Huang H., Yang M., Xu B., Chen G. Microbial hydroxylation and glycosidation of oleanolic acid by *Circinella muscae* and their anti-inflammatory activities // *Natural Product Research*. – 2018. – Vol. 33, № 13. – P. 1849–1855.

195. Yang F., Dong X., Yin X., Wang W., You L., Ni J. Radix Bupleuri: A review of traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, and toxicology // *BioMed Research International*. – 2017. – Vol. 2017. – Article 7597596.
196. Yoon Y., Lim J.W., Kim J., Kim Y., Chun K.H. Discovery of ursolic acid prodrug (NX-201): Pharmacokinetics and *in vivo* antitumor effects in PANC-1 pancreatic cancer // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26, № 22. – P. 5524–5527.
197. Yu F., Wang Q., Zhang Z., Peng Y., Qiu Y., Shi Y., Zheng Y., Xiao S.-L., Wang H., Huang X., Zhu L., Chen K., Zhao C., Zhang C., Yu M., Sun D., Zhang L., Zhou D. Development of oleanane-type triterpenes as a new class of HCV entry inhibitors // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol. 56, № 11. – P. 4300–4319.
198. Zhang C., Yang L., Ding Y., Wang Y., Lan L., Ma Q., Chi X., Wei P., Zhao Y., Steinbüchel A., Zhang H., Liu P. Bacterial lipid droplets bind to DNA *via* an intermediary protein that enhances survival under stress // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – Article 15979.
199. Zhang C., Xu S.-H., Ma B.-L., Wang W., Yu B.-Y., Zhang J. New derivatives of ursolic acid through the biotransformation by *Bacillus megaterium* CGMCC 1.1741 as inhibitors on nitric oxide production // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 27, № 11. – P. 2575–2578.
200. Zhang G., Cao Q., Liu J., Liu B., Li J., Li C. Refactoring  $\beta$ -amyrin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *AIChE Journal*. – 2015. – Vol. 61, № 10. – P. 3172–3179.
201. Zhang J., Liu F., Zhang X. Inhibition of proliferation of SGC7901 and BGC823 human gastric cancer cells by ursolic acid occurs through a caspase-dependent apoptotic pathway // *Medical Science Monitor*. – 2019. – Vol. 25. – P. 6846–6854.
202. Zhang J., Cheng Z.-H., Yu B.-Y., Cordell G.A., Qiu S.X. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646 // *Tetrahedron Letters*. – 2005. – Vol. 46, № 13. – P. 2337–2340.
203. Zhang S., Sun Y., Sun Z., Wang X., You J., Suo Y. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 146. – P. 264–269.

204. Zhang S.S., He L.-S., Zhao Y.-M., Fu S., Liu D.-L., Yu Z.-H., Liu B.-C. Three new triterpenoids transformed from ursolic acid by *Mucor spinosus* AS3.3450 and their cytotoxicity // *Phytochemistry Letters*. – 2019. – Vol. 32. – P. 33–37.
205. Zhang X., Peng Y., Zhao J., Li Q., Yu X., Acevedo-Rocha C.G., Li A. Bacterial cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective steroid hydroxylation enabled by directed evolution and rational design // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2020. – Vol. 7, № 2. – P. 1–18.
206. Zhao Y., Fan J., Wang C., Feng X., Li C. Enhancing oleanolic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 257. – P. 339–343.
207. Zhou J., Cai W., Jin M. Xu J., Wang Y., Xiao Y., Hao L., Wang B., Zhang Y., Han J., Huang R. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibition of microglia activation and promotion of remyelination // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – Article 13713.
208. Zhu M., Wang C., Sun W., Zhou A., Wang Y., Zhang G., Zhou X., Huo Y., Li C. Boosting 11-oxo- $\beta$ -amyrin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants // *Metabolic Engineering*. – 2018. – Vol. 45. – P. 43–50.
209. Zhu Y.Y., Qian L.-W., Zhang J., Liu J.-H., Yu B.-Y. New approaches to the structural modification of olean-type pentacyclic triterpenes *via* microbial oxidation and glycosylation // *Tetrahedron*. – 2011. – Vol. 67, № 23. – P. 4206–4211.
210. Zou L.W., Dou T.-Y., Wang P., Lei W., Weng Z.-M., Hou J., Wang D.-D., Fan Y.-M., Zhang W.-D., Ge G.-B., Yang L. Structure-activity relationships of pentacyclic triterpenoids as potent and selective inhibitors against human carboxylesterase 1 // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – Article 435.