

**Е. А. ЧЕРНЯВСКИЙ, Н. С. ФРОЛОВА, Е. В. РУДАЯ,
В. М. ШКУМАТОВ**

УЛЬТРАЗВУК И ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Два обстоятельства ограничивают более широкое использование современных биотехнологических подходов для синтеза стероидов в качестве альтернативы экологически небезопасным химическим технологиям. Первое связано с тем, что природные микроорганизмы, помимо синтеза целевого стероида, как правило, имеют дополнительные ферментные системы, приводящие к появлению побочных продуктов [1–3]. Этот принципиальный недостаток природных микроорганизмов на современном этапе развития науки можно преодолеть, если воспользоваться гетерологической экспрессией. В хорошо охарактеризованных системах «хозяин-вектор» можно объединить строгую регио- и стереоспецифичность ферментов стероидогенеза млекопитающих и биотехнологические преимущества клеток микроорганизмов. В частности, осуществлена функциональная гетерологическая экспрессия системы 17 α -гидроксилирования стероидов с использованием бактерий и дрожжей [4–8].

Другое ограничивающее обстоятельство – низкая растворимость стероидов в водных средах. Для преодоления этого ограничения используют смешивающиеся с водой растворители, двухфазные системы, диспергируют субстраты на мицеллах поверхностно-активных веществ, а также добавляют циклодекстрины для образования комплексов включения со стероидами [1]. Безусловно, дополнительное введение химических реагентов в биотехнологический процесс усложняет его аппаратное оформление, невыгодно с точки зрения экономического эффекта, экологических последствий и токсического действия на биокатализаторы.

Применение ультразвука (УЗ) перспективно для повышения эффективности биотрансформаций за счет микронизации гидрофобного субстрата, гомогенизации популяции клеток, улучшения проницаемости оболочек и мембран клеток микроорганизмов для субстрата и продукта [9]. Вместе с тем процесс кавитации под действием УЗ высокой мощности оказывает повреждающее действие на клетки микроорганизмов [11, 12]. Кавитация вызывает интенсивное локальное повышение температуры, достигающей более 4000 °С и давления в кавитационных пузырьках около 1000 атм. [9]. Во время ультразвукового облучения в водных растворах при интенсивном коллапсе кавитационных пузырьков образуются также реакционноспособные свободные радикалы (ОН, NO₂[·] и O[·]). Учи-

тывая указанные позитивные и негативные эффекты, подбор оптимальных условий УЗ обработки представляется важным для повышения генетически-обусловленного потенциала трансгенных микроорганизмов для целей биотрансформации стероидных субстратов.

Цель данной работы заключалась в установлении режимов ультразвуковой обработки, улучшающих биотехнологические свойства трансгенных дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующих цитохром P450c17 млекопитающих.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исходные и трансформированные штаммы микроорганизмов. Исходный штамм *Y. lipolytica* E129 (*MATA leu2-270 ura3-302 xpr2-322 lys11-23*) использовали для трансформации с интегративной плазмидой p67IC17 α . Вектор содержал экспрессионную кассету с геном *CYP17* под контролем промотора и терминатора изоцитратлиазы (индукция алканами, жирными кислотами, этанолом; репрессия глюкозой). Результирующий диплоидный прототрофный штамм *Y. lipolytica* E129A15 получен путем скрещивания со штаммом A1-5 (*MATB met Alk⁺*) [7, 12].

Культивирование, ультразвуковая обработка и биотрансформация стероидов. Ночную культуру *Y. lipolytica* E129A15/17 α культивировали на среде YPD («Difco»): 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептон и 0,4 % глюкоза в течение 24 ч. Если специально не оговорено, индукцию синтеза P-450c17 осуществляли этиловым спиртом или гексадеканом (конечные концентрации 1 %) одновременно с добавлением прогестерона после полного потребления культурой глюкозы. Ультразвуковую обработку микробной культуры проводили на стадиях выращивания ночной культуры, индукции синтеза цитохрома P450c17 или на индуцированных клетках. В работе применяли систему с УЗ-генератором, пьезоэлектрическим преобразователем и волноводом. Выходная мощность генератора 80 Вт с возможностью ступенчатой регулировки удельной мощности. Рабочая частота пьезопреобразователя 27 кГц. УЗ-генератор работает в импульсном режиме с регулируемой скважностью цикла [13].

Биотрансформацию стероидов культурой клеток проводили на установке УВТМ при 28–29°C, pH 5–6 в условиях аэрации (200 об/мин). Анализ продуктов биотрансформаций осуществляли методом ВЭЖХ, для установления структуры побочных продуктов использовали ГЖХ-масс-спектрометрию и ¹H ЯМР-спектроскопию [6, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние УЗ на число оборотов цитохрома P450c17и скорость роста трансгенных микроорганизмов. Для оценки действия УЗ на ак-

тивность гетерологично экспрессированного белка использовали гексадекан-индуцированные клетки диплоидных дрожжей *Y. lipolytica* E129A15/17 α , синтезирующих цитохром P450c17 из микросом коры надпочечников быка. Использовали суспензию клеток с оптической плотностью (в расчете на 1 см оптического пути) $OD_{600nm} = 5,0$ (2×10^7 клеток/см³). Клетки облучали УЗ в течение 1–5 мин при мощности 1,2–15,4 Вт/см³ и скважности 50 %. Концентрация прогестерона 10 мкМ, время его биотрансформации 30 мин.

Установлено, что действие УЗ носило активирующий характер при облучении мощностью 1,2 Вт/см³ и 2,4 Вт/см³ с увеличением числа оборотов n ($n = 1$ моль образующегося прогестерона в расчете на 1 моль P450c17 в минуту) на 39 % и 17 % по сравнению с контрольным образцом. При мощности 3,6 Вт/см³ n находилось в пределах контрольных величин 32–38 мин⁻¹. Дальнейшее увеличение мощности УЗ характеризовалось уменьшением активности до 20 мин⁻¹ и 12 мин⁻¹ при 7,2 Вт/см³ и 15,4 Вт/см³ после 300 с облучения. Представление данных в координатах: $\log(n/n_0)$ – время УЗ обработки позволило определить константы скорости инактивации, которые составили 0,0008 с⁻¹ при 7,2 Вт/см³ и 0,00133 с⁻¹ при 15,4 Вт/см³ (рис. 1).

Различное время УЗ воздействия на клетки на стадии прироста биомассы сопровождалось близкой кинетикой роста с характерными сигмоидальными кривыми. Обнаружено, что УЗ мощностью 7,2 и 15,4 Вт/см³ вызывает увеличение продолжительности лаг-фазы роста. В то же время к окончанию логарифмической фазы роста плотность клеток была практически одинаковой как для контрольного эксперимента, так и для клеток, подвергнутых воздействию УЗ. Негативный эффект УЗ на рост популяции клеток обнаруживается при их концентрации ниже 10^5 клеток/см³ и усиливается с уменьшением концентрации клеток. В разбавленных суспензиях (10^3 – 10^4 клеток/см³) обнаруживается повреждающий эффект УЗ, сопровождающийся нарушением целостности клеток и высвобождением внутриклеточных белков.

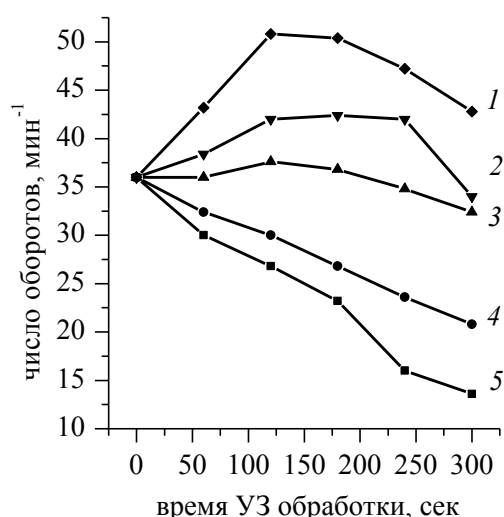


Рис. 1. Зависимость активности цитохрома P450c17 в составе штамма *Y. lipolytica* E129A15 от времени обработки ультразвуком мощностью (Вт/см³): 1 – 1,2; 2 – 2,4; 3 – 3,6; 4 – 7,2; 5 – 15,4

Влияние УЗ на скорость синтеза цитохрома P450c17 и уровень его экспрессии. Синтез P450c17 инициировали добавлением индуктора промотора изоцитрат-лиазы - этанола, содержащего прогестерон (конечные концентрации 1 % и 10 мкМ соответственно). Время выхода 17 α -гидроксипрогестерона на уровень 50 % принимали за относительную скорость экспрессии P450c17. При времени экспонирования УЗ 3 мин и мощности 1,2 Вт/см³ обнаружен стимулирующий эффект УЗ на скорость экспрессии P450c17. Время 50 %-биотрансформации составило 45 мин, в то время как для контроля этот показатель составил 65 минут. Напротив, воздействие УЗ мощностью 7,2 Вт/см³ сопровождалось уменьшением скорости синтеза цитохрома P450c17, так как 50 % конверсия прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон была достигнута через 110 мин.

Установлено, что уровень синтеза цитохрома P450c17 не изменялся в зависимости от времени экспонирования УЗ от 2,5 до 15 мин и мощности 1,2–3,6 Вт/см³ и составлял 10–15 пкмоль P450c17 в 1 см³. С увеличением мощности УЗ до 15,4 Вт/см³ стационарный уровень синтеза цитохрома P450c17 уменьшался параллельно с ростовыми характеристиками популяции трансгенных микроорганизмов.

Влияние УЗ на NADPH-зависимую цитохром P450 редуктазу (CPR) в экстрактах клеток, число копий гена P450c17 и ферменты-ортологи 20(α , β)-гидроксистероид дегидрогеназ. В условиях кавитации возможно образование активных форм кислорода, которые могут изменить активность окислительно-восстановительных ферментов клетки.

При УЗ обработке мощностью 1,2–3,6 Вт/см³, продолжительностью 60–300 с со скважностью 50 % не обнаружено изменений активности CPR в бесклеточных экстрактах. В этих же условиях исследована стабильность интеграции многокопийных плазмид трансформантов после роста. Для этого, после УЗ обработки, клетки культивировали в течение 30 ч (17 генераций) на минимальных средах с различными источниками углерода. Далее выделяли геномную ДНК, расщепляли с помощью рестриктазы *VamHI* и определяли число копий как соотношение фрагментов *ICL1* и *lacZ*. В исследованных условиях УЗ обработки число копий у трансформантов составляло 6–15 и было стабильным.

В аналогичных условиях УЗ обработки исследована ко-экспрессия P450c17 и белков-ортологов 20 α - и 20 β -гидроксистероид дегидрогеназ. Эти ферменты синтезируются после индукции P450c17 этанолом на среде YPD при наличии 0,2–0,5 % остаточной глюкозы [12]. Установлено, что действие УЗ не изменяет соотношений стероидных продуктов – 17 α -гидроксипрогестерона и соответствующих 17,20-диолов прогестерона.

Следовательно, УЗ обработка не вызывает селективной инактивации указанных белков-ортологов.

Повышение эффективности 17 α -гидроксилирования прогестерона под действием УЗ. В табл. 1 приведены данные по выходам всех стероидных соединений, образующихся в результате биотрансформаций двух препаратов прогестерона, приготовленных с использованием индукторов синтеза Р450с17 – этилового спирта и гексадекана.

Таблица 1

Выходы стероидов (%) после 24-часовых биотрасформаций прогестерона трансгенными клетками *Y. Lipolytica* E129A15

№ п/п	Условия	стероиды				
		Про	17 α -ОН-Про	17 α ,20 α (ОН) ₂	17 α ,20 β (ОН) ₂	Ад
1	Про+Эт+Кл	42,0	48,0	3,0	6,5	0,5
2	(Про+Эт+Кл)+УЗ	35,0	57,0	4,0	3,3	0,7
3	(Про+Эт+ УЗ)+Кл	25,0	62,0	7,0	5,3	0,7
4	Про+ГД+Кл	25,0	63,0	3,9	7,1	1,0
5	(Про+ГД+Кл)+УЗ	4,9	85,1	1,9	7,6	0,5
6	(Про+ГД+УЗ)+Кл	–	98,0	0,7	0,7	0,6

[Про] 600 мкМ, [Эт] 1 %, [ГД] 1 %.

Про – прогестерон; 17 α -ОН-Про – 17 α -гидрокси-прогестерон; 17 α ,20 α (ОН)₂ – 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-он; 17 α ,20 β (ОН)₂ – 17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-он; Ад – андростендион; ГД – гексадекан; Эт – этанол; Кл – клетки.

Из этих данных следует, что наиболее приемлемым вариантом синтеза 17 α -гидроксипрогестерона является вариант № 6, когда 600 мкМ прогестерон, приготовленный на гексадекане, и среда УР обработаны УЗ и эта смесь добавлена к трансгенным клеткам *Y. lipolytica*. В этом варианте выход целевого продукта составил 98 %, что существенно выше, чем полученный в работе [3]. Из побочных продуктов отмечено образование с низким выходом каждого из сопутствующих продуктов: 17 α ,20 α - и 17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, 20 α -дигидропрогестерон (побочные продукты, образующиеся под действием ферментов-ортологов 20 α - и 20 β -гидроксистероиддегидрогеназ), андростендиона (продукт С17,20-лиазной реакции). Для сравнения отметим, что вариант № 5, в котором одновременно озвучивались как субстрат, так и клетки, характеризовался выходом 17 α -гидроксипрогестерона 85 %. Это является, однако, более высоким показателем, чем вариант № 4, когда клетки трансформировали прогестерон, суспендированный в гексадекане без обработки УЗ. В целом же необходимо отметить более высокую эффективность биотрансформаций прогестерона с участием гексадекана по сравнению с использованием вариантов, предусматривающих приготовление прогесте-

рона на этаноле (табл. 1). В этом варианте число оборотов n составило более 100 мин^{-1} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в основе стимулирующего действия УЗ на процесс биопревращения прогестерона в 17α -гидроксипрогестерон с помощью трансгенных дрожжей *Y. lipolytica* лежит повышение эффективности массопереноса субстрата в клетку и выведения целевого продукта, связанное с повышением концентрации растворимого прогестерона. УЗ также интенсифицирует процесс переноса кислорода из газовой среды в жидкость, повышает реакционную межповерхностную площадь, что важно для осуществления реакций гидроксирования. УЗ в оптимальных режимах способствует ускорению роста микроорганизмов и повышению скорости экспрессии цитохрома P450c17.

Вместе с тем, интенсивный УЗ при увеличении времени его экспонирования вызывает разрушение клеток шокowymi волнами, что сопровождается уменьшением выхода целевого стероидного продукта. Интенсивный УЗ повреждает макромолекулы ферментов за счет разворачивания и агрегации нативных белков и повышает эндогенную протеолитическую модификацию [13–16].

Использование УЗ в настоящей работе позволяет обосновать преимущества трансгенных клеток *Y. lipolytica* перед системой «вектор-хозяин» на основе бактерий *E. coli*. Эффективные системы экспрессии, разработанные для бактерий *E. coli* позволяют осуществлять синтез цитохрома P450c17 в больших количествах. При ко-экспрессии CPR и P450c17 получены высокие значения функциональной активности *in vivo* ($n = 54\text{--}68 \text{ мин}^{-1}$) [5]. С использованием УЗ нами достигнуты без дополнительной экспрессии CPR значения функциональной активности более 100 мин^{-1} .

Дрожжи значительно более устойчивы к механическому разрушению шокowymi волнами и микропотоками, возникающими при действии УЗ, чем бактерии *E. coli*. Сдвиговый стресс для разрушения половины популяции *E. coli* составляет 15 МПа, а для дрожжей – 150 МПа [11]. В условиях активного массопереноса в промышленных ферментерах, работающих в условиях интенсивного перемешивания и аэрации возможно разрушение части клеток или стрессовое воздействие на клетки, изменяющее функциональные свойства трансгенных микроорганизмов.

Обычно при гетерологической экспрессии в бактериях *E. coli* используют для индукции чужеродных белков изопропил β -D-тиогалактопиранозид, достаточно дорогой индуктор. Нами специально

созданы системы экспрессии цитохрома P450c17, функционирующие под контролем сильного промотора изоцитрат-лиазы, регулируемого простыми индукторами – этанолом, гексадеканом, жирными кислотами. Эти индукторы вызывают также повышение синтеза CPR, необходимой для катализа и являются одновременно растворителями для субстратов. В работе [5] была использована дополнительная коэкспрессия CPR, поскольку собственные электронтранспортные белки *E.coli* малоактивны в реакции 17 α -гидроксилирования. Дрожжи *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* содержат собственные CPR, функционально сопряженные в реакции гидроксилирования [6, 7]. Глюкоза, абсолютно необходимая для регенерации кофактора NADPH в случае биотрансформаций с *E.coli* [5], может приводить к образованию побочных продуктов – 17 α ,20($\alpha\beta$)-диолов прогестерона, а также дополнительных продуктов в реакции, катализируемой 17 β -гидроксистероид дегидрогеназой [6, 7, 12]. Использование этанола или гексадекана в качестве источника энергии и углерода в значительной мере снижает образование этих побочных стероидов. У дрожжей *Y. lipolytica* имеются специальные системы транспорта субстратов и продуктов, они синтезируют также специальный эмульгатор липосан для растворения гидрофобных субстратов.

Все эти преимущества трансгенных микроорганизмов позволили осуществить практически количественное превращение исходного прогестерона в целевой продукт – 17 α -гидроксипрогестерон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fernandes P., Cruz A., Angelova B. et al. // Enzyme Microb. Technol. 2003. Vol. 32. P. 688–705.
2. Lu W., Du L., Wang M. et al. // Trans. IChemE, Part C, Food and Bioproducts Proc. 2007. Vol. 85(C1). P. 63–72.
3. Manosroi J., Saowakhon S., Manosroi A. // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2008. Vol. 112. P. 201–204.
4. Sakaki T., Shibata M., Yabusaki Y. et al. // DNA. 1989. Vol. 8, № 6. P. 409–418.
5. Shet M. S., Fisher C. W., Estabrook R. W. // Arch. Biochem. Biophys. 1997. Vol. 339. № 1. P. 218–225.
6. Shkumatov V. M., Usova E. V., Poljakov Y. S. et al. // Biochemistry (Mosc). 2002. Vol. 67. P. 547–558.
7. Shkumatov V. M., Usova E. V., Radyuk V. G. et al. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2003. Vol. 29. P. 640–649.
8. Szczebara F. M., Chandelier C., Villeret C. et al. // Nature. Biotechnol. 2003. Vol. 21. P. 143–148.
9. Chisti Y. // Trends in Biotechnol. 2003. Vol. 21, № 2. P. 89–93.
10. Tsukamoto I., Yim B., Stavarache C. E. et al. // Ultrason. Sonochem. 2004. Vol. 11. P. 61–65.

11. *Iida Y., Tuziuri T., Yasui K. et al.* // *Ultrason. Sonochem.* 2008. Vol. 15. P. 995-1000.
12. *Shkumatov V.M., Frolova N.S., Rudaya E.V. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006. Vol. 42. P.143-151.
13. *Ovsianko S.L., Chernyavsky E.A., Minchenya V.T. et al.* // *Ultrason. Sonochem.* 2005. Vol. 12. P. 219-223.
14. *Шкуматов В.М., Адзерихо И.Э., Лесникович Ю.А.* // *Биомед. химия.* 2003. Т. 49. № 2. С. 183-190.
15. *Шкуматов В.М., Адзерихо И.Э., Лесникович Ю.А., Чернявский Е.А.* // *Биохимия.* 2004. Т. 69. № 2. С. 243-250.
16. *Cherniavsky E.A., Adzerikho I.E., Shkumatov V.M.* // *Biochemistry (Moscow) Suppl. B: Biomed. Chem.* 2009 V. 3. № 2. P. 164-171