



УДК 547.962.5.04+576.8.095

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ВКМу-488  
ДЛЯ АСИММЕТРИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ  
3-МЕТОКСИ- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-СЕКОЭСТРАТЕТРАЕНДИОНА-14,17

Гулая В. Е., Ананченко С. Н., Торгов И. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Кощеев К. А., Бычкова Г. Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, Пущино

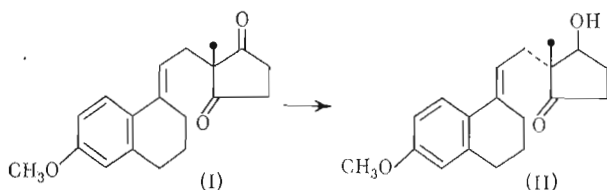
Показана возможность направленного стереоспецифического восстановления 3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетраендиона-14,17 клетками культуры *Saccharomyces cerevisiae* ВКМу-488, иммобилизованными в полиакриламидном геле. Установлено, что оптимальными условиями иммобилизации являются: 10% гель при соотношении акриламида и метиленбисакриламида 95:5,5, температура полимеризации 5–12°, биомасса 30–50 мг на 1 мл смеси для полимеризации, величина гранул 1–2 мм в диаметре, использование индуцированной культуры в конце логарифмической фазы роста. Оптически активный 3-метиловый эфир  $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетраендиол-3,17-она-14 получен с выходом до 85–90% при периодическом режиме трансформации и условиях: температура 28°, рН буферного раствора 6,0, концентрация субстрата 1 г/л, биомасса – 6 г/л. Стабильность 17 $\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности иммобилизованных клеток была увеличена в 30 раз после однократной инкубации гранул в питательной среде.

В последние годы все большее внимание микробиологов, а также химиков-синтетиков наряду с иммобилизацией ферментов привлекает новое направление — иммобилизация клеток микроорганизмов. Иммобилизованные клетки в условиях непрерывной трансформации использованы для получения аспарагиновой [1] и 6-аминопенициллановой кислот [2], цитруллин [3], фруктозы [4] и ряда других важных соединений. Показана возможность применения иммобилизованных клеток для трансформации стероидных соединений: 1,2-дегидрирования, 11 $\alpha$ - и 11 $\beta$ -гидроксилирования [5], восстановления 20-кетогруппы до 20 $\alpha$ - и 20 $\beta$ -оксигрупп [6].

Настоящая работа посвящена разработке эффективного микробиологического метода асимметрического восстановления 3-метокси- $\Delta^{1,3,5(10),9(11)}$ -8,14-секоэстратетраендиона-14,17 [1], являющегося промежуточным продуктом в полном синтезе эстрогенных гормонов. С этой целью было изучено влияние различных условий полимеризации и трансформации на 17 $\beta$ -оксистероиддегидрогеназную активность иммобилизованных клеток *Saccharomyces cerevisiae* ВКМу-488.

Использование метода микробиологической асимметризации в предложенном нами ранее синтезе стероидов [7] позволяет ввести асимметрический центр в оптически неактивный секостероид, получаемый на ранних

стадиях полного синтеза [8]. При этом соединение (VI) в оптически чистой форме может быть получено с выходом, значительно большим, чем 50%.



Нами было обнаружено [9], что клетки культуры *S. cerevisiae* ВКМу-488 не только в нативном виде, но и в иммобилизованном состоянии обладают высокой стереонаправленностью действия и дают оптически чистый секокетол (II). Для иммобилизации клеток этой культуры было использовано включение их по известной методике в полиакриламидный гель (ПААГ) [5].

На первом этапе исследований было изучено влияние различных условий полимеризации, а именно соотношения мономеров, влияния размера пор геля на диффузию субстрата, влияние температурного режима, концентрации биомассы и физиологического состояния культуры на ферментативную активность иммобилизованных клеток.

Изменение соотношения мономеров акриламида и метиленбисакриламида в пределах 95:2,7; 95:5,5; 95:8,2 не сказалось на ферментативной активности гранул: выход секокетола составил 70, 73 и 68% соответственно при биомассе 30 мг/мл смеси для полимеризации и 6 мг/мл в среде для трансформации, концентрации стероида 0,6 мг/мл и времени трансформации 22 ч.

Для оценки влияния размера пор геля на диффузию субстрата исследовали 10, 20 и 30% гели. Оказалось, что ферментативная активность, а следовательно, и диффузия субстрата не увеличивается с изменением размера пор в данном интервале. Лучшими механическими свойствами обладает 10% гель, поэтому его и использовали в дальнейшей работе. Обычно процесс полимеризации проводится в атмосфере инертного газа. В нашем случае активность иммобилизованных клеток не изменялась при замене инертного газа воздухом.

Сравнение активности клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488, взятых для иммобилизации в различном физиологическом состоянии (в конце логарифмической фазы роста, середине и конце стационарной фазы роста, 1, 2 и 3 сут соответственно), показало, что активность практически не зависит от возраста культуры.

Нами было изучено влияние концентрации биомассы в смеси для полимеризации на скорость реакции и на стабильность ферментативной активности. Известно, что этот фактор может определять не только скорость, но и направление реакции [5]. Мы вводили 15, 30 и 50 мг биомассы на 1 мл. Как следует из данных табл. 1, оптимальное содержание биомассы составляет 30 мг/мл смеси для полимеризации.

Известно, что температурный режим процесса полимеризации может значительно влиять на жизнеспособность и ферментативную активность иммобилизованного микроорганизма [10, 11]. Как правило, он не совпадает ни с оптимумом температуры для роста культуры, ни с оптимумом проявления ферментативной активности. При повышении температуры полимеризации от 8 до 37° (табл. 2) удельная активность клеток резко падает (с 6,7 ед./г клеток до 0); оптимальной температурой для полимеризации является 8—12°.

Как показал макрокультуральный анализ, с повышением температуры до 20° и выше количество жизнеспособных клеток в геле во время полимеризации уменьшается, а при 37° жизнеспособные клетки единичны, что

Таблица 1

Зависимость 17  $\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488 от количества биомассы, используемой для полимеризации \*

Биомасса, мг/мл полимеризационной смеси	Выход секокетола, %	Уд. акт., ед. **/г клеток
15	5	1,6
30 ***	20	3,3
50	23	2,3

\* Культура не индуцирована; условия полимеризации: 10% гель, соотношение акриламида и метиленбисакриламида 95:5,5, температура 12°, размер гранул 1 мм в диаметре. Условия трансформации: время 2 ч, рН 5,8, концентрация в среде для трансформации биомассы 6 мг/мл и субстрата — 0,2 мг, температура 28°.

\*\* За единицу активности принимается активность, вызывающая превращение 1 мг продукта за 1 ч.

\*\*\* Отмечена концентрация, используемая в дальнейших опытах (где не оговорено).

Таблица 2

Влияние температурных условий во время процесса полимеризации на ферментативную активность иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488 \*

Температура, °С	Выход секокетола, %	Уд. акт., ед./г клеток
8–10	40	6,7
10–12	40	6,7
18–20	25	4,1
28–30	15	2,6
37–38	Следы	—

\* Культура индуцирована. Условия полимеризации и трансформации см. в табл. 1.

приводит к полной потере активности. Интересно, что такой же ингибирующий эффект оказывало выдерживание клеток в растворе акриламида при 37° в течение 30 мин. Это согласуется с данными о токсическом действии акриламида на стероидные гидроксилы, полученные ранее Г. К. Скрыбиным с соавт. [5].

В ряде случаев величина гранул геля оказывает значительное влияние на ферментативную активность [12]. Наши результаты свидетельствуют о том, что при изменении диаметра гранул с клетками от 0,5 до 5 мм их ферментативная активность мало изменяется. Некоторое увеличение активности (с 5 до 6 ед./г клеток) наблюдается при величине гранул 1–2 мм в диаметре.

Известно, что 17  $\beta$ -оксистероиддегидрогеназа — индуцируемый фермент [13]. Нами показано (см. табл. 1, 2), что активность индуцированной культуры *S. cerevisiae* в 2–3 раза выше, если в качестве индуктора на стадии роста использовать андростендион.

Таким образом, оптимальными для процесса иммобилизации являются следующие условия: использование клеток, выращенных в присутствии индуктора — андростендиона до конца логарифмической либо стационарной фазы роста, при концентрации биомассы 30 мг/мл смеси реагентов для полимеризации, соотношении акриламида и метиленбисакриламида 95:5,5, 10%-ном геле, температуре 8–12° и величине гранул 1–2 мм в диаметре. Удельная активность клеток, иммобилизованных указанным способом, составляет 10–15 ед./г клеток при проведении трансформации в следующих условиях: концентрация биомассы в среде для

Таблица 3

Зависимость 17  $\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности от температуры во время процесса трансформации \*

Температура трансформации, °С	Выход секонетона, %	Уд. акт., ед./г клеток
4	5	2,5
28	20	10,0
37	20	10,0
45	25	12,5

\* Культура индуцирована. Условия полимеризации см. в табл. 1; условия трансформации: концентрация стероида 0,6 г/л; остальные как в табл. 1.

Таблица 4

## Влияние концентрации субстрата на активность иммобилизованных клеток \*

Концентрация субстрата, мг/мл	Выход секонетона (%) при трансформации		Уд. акт., ед./г клеток
	2 ч	24 ч	
0,6	30	80	15,0
1,0	20	90	16,7
2,0	10	40	16,7
3,0	4	10	10,0

\* Культура индуцированная, условия полимеризации и трансформации см. в табл. 1.

Таблица 5

## Влияние концентрации биомассы в реакционной среде на ферментативную активность \*

Биомасса, мг/мл	Объем гранул геля, мл	Выход секонетона, %	Уд. акт., ед./г клеток
3	9	75,0	20,0
6	18	90,0	16,6
12	36	80,0	10,4

\* Культура индуцирована; условия иммобилизации и трансформации см. в табл. 1; концентрация субстрата 1 мг/мл, время трансформации 24 ч при полном превращении секонидона.

трансформации 6 мг/мл, стероида — 0,6 мг/мл, рН буферного раствора 5,8—6,0, температура 28°, на качалке при 220 об/мин. Полная трансформация стероида в этих условиях достигается за 22—24 ч.

На втором этапе работы исследовалось влияние различных факторов (температура, рН, присутствие ионов двухвалентных металлов, детергентов, концентрация биомассы и субстрата) на ферментативную активность иммобилизованных клеток и стабильность их действия.

Было установлено, что температурный оптимум ферментативной активности иммобилизованных клеток такой же, как у свободных клеток, и находится в диапазоне 28—45° (табл. 3). Однако при температуре выше 28° уменьшается стабильность действия иммобилизованных клеток. Некоторым защитным эффектом обладают ионы  $Mn^{2+}$  и  $Ba^{2+}$  (в концентрации 1 мМ). Так, при ферментации в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  и  $Ba^{2+}$  при 37 и 45° ферментативная активность на 5 и 10% соответственно больше по сравнению с контролем. Стабильность действия гранул с клетками также

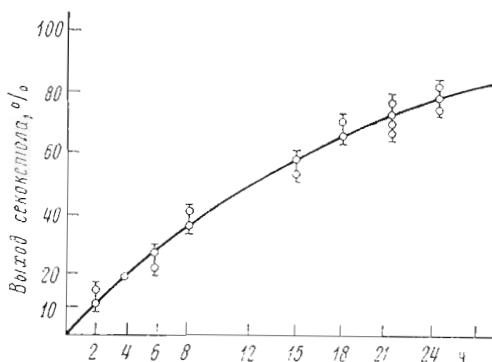


Рис. 1. Кинетика 17  $\beta$ -восстановления метилового эфира секодона (I) до секокетола (II) клетками культуры *S. cerevisiae* ВКМу-488, иммобилизованными в ПААГ в оптимальных условиях иммобилизации и трансформации (см. текст)

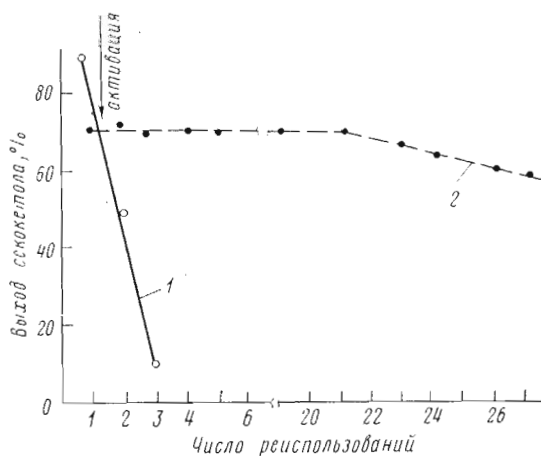


Рис. 2. 17  $\beta$ -Оксистероиддегидрогеназная активность иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488 при их многократном использовании в оптимальных условиях полимеризации и трансформации (см. текст): 1 — активность клеток в гранулах при трехразовом использовании (время каждой трансформации 24 ч), 2 — активность клеток в гранулах при условии инкубации их в питательной среде (24 ч) после 1-й трансформации (время каждой трансформации 20 ч)

повышается, но остается ниже, чем при 28°. При 28° ионы  $Mn^{2+}$  и  $Ba^{2+}$ , а также ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  не влияют на ферментативную активность. Ионы  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Sr^{2+}$  практически полностью ингибируют процесс трансформации. Эксперименты по влиянию ионов металлов ставились в стандартных условиях (см. табл. 2) при концентрации субстрата 0,6 г/л. Ингибирующий эффект может быть связан как с непосредственным действием на 17  $\beta$ -оксистероиддегидрогеназу клетки, так и на структурные компоненты мембраны клетки, ответственные за транспорт субстрата внутрь клетки [14].

Изменение pH буферного раствора в области 4,6—6,9 почти не сказывается на ферментативной активности как свободных, так и иммобилизованных клеток. При pH ниже 4,0 и выше 8,0 возможно неферментативное превращение метилового эфира секодона (I), поэтому мы не исследовали эти условия.

С целью повышения проницаемости клеточной оболочки для субстрата и продукта реакции было изучено влияние различных ионных

и неионных детергентов на ферментативную активность свободных и иммобилизованных дрожжей на стадии трансформации. Как оказалось, в присутствии неионных детергентов (0,1%) — твинов, спанов и тритона X 100 — изменения скорости 17 $\beta$ -восстановления не происходит. Бромистый цетилтриметиламмоний оказывает ингибирующий эффект на клетки в свободном и иммобилизованном состоянии. При этом почти полностью подавляется и жизнеспособность клеток.

Известно, что эффективность процесса трансформации определяется главным образом концентрацией исходного субстрата. Нами было установлено (см. табл. 4), что изменение концентрации секодиона в интервале 0,6—2,0 мг/мл среды не влияет на удельную активность клеток. Однако при концентрации субстрата 2 и 3 мг/мл выход продукта трансформации значительно уменьшается. Попытка увеличить выход секокетола за счет повышения концентрации биомассы до 12 мг/мл не дала положительного результата.

Как следует из данных табл. 5, оптимальной биомассой при концентрации стероида 1 мг/мл является 6—12 мг/мл. Таким образом, для 17 $\beta$ -восстановления секодиона (I) иммобилизованными клетками оптимальны следующие условия: pH 5,9, температура 28 $^{\circ}$ C, концентрация стероида и биомассы 1 и 6 мг/мл соответственно. Кинетика процесса в этих условиях представлена на рис. 1. Полное превращение секодиона происходит в этих условиях за 24—27 ч, выход секокетола достигает 85—90%. Наряду с 17 $\beta$ -восстановлением происходит образование побочных продуктов в незначительном количестве (10—15%).

Согласно рис. 2, активность иммобилизованных клеток в указанных выше условиях трансформации не стабильна. При втором использовании гранул ферментативная активность составляет 54%, а при третьем — 9% от исходной активности иммобилизованных клеток. После однократной инкубации в питательной среде с индуктором (андростендионом) в течение суток с последующим отмыванием от среды и свободных клеток буфером или физиологическим раствором активность повысилась до первоначального уровня. Более того, этот уровень активности сохраняется в течение 20—25 сут после 21—22 трансформаций по 20 ч каждая. Затем наблюдалось постепенное снижение скорости трансформации. Однако и при 26—30-м использовании гранул возможно полное превращение субстрата за 40—48 ч трансформации. Использование таких активированных гранул позволило повысить их производительность в 30 раз: так, производительность 1 г неактивированного геля с клетками — 4,5 мг, а активированного — 135 мг (расчет дан для 80—90% трансформации). Причиной такой активации, как нами было показано ранее [16], является: 1) образование новой поверхностной и, вероятно, внутренней популяции дрожжей после инкубации в питательной среде; 2) более длительное сохранение ультраструктуры клеток после проведения инкубации в питательной среде.

Таким образом, проведено детальное изучение условий для оптимального проявления 17 $\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488. Показано, что ферментативная активность определяется как условиями, в которых идет процесс полимеризации, так и условиями трансформации. В оптимальных условиях полное превращение секодиона (I) возможно при концентрации 1 г/л. Стабилизация 17 $\beta$ -оксистероиддегидрогеназной активности иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* ВКМу-488 происходит при дополнительной инкубации гранул с клетками в питательной среде.

### Экспериментальная часть

Культура *S. cerevisiae* ВКМу-488 получена из Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии АН СССР. Культуру поддерживали на сусло-агаре и затем суспензией дрожжей

засевали конические колбы объемом 750 мл со 150 мл жидкого сусла (7 Б°) \*. Инокулят выращивали 20–24 ч на круговой качалке (220 об/мин, 28°). Инокулятом (10% по объему) засевали колбы с суслиом в тех же условиях выращивали дрожжи для полимеризации и трансформации. В отдельных случаях выращивание культуры проводили в присутствии индуктора 17 β-оксистероиддегидрогеназы — андростендиона (15 мг в 15 мл этанола на 150 мг среды). Количество биомассы определяли нефелометрически с последующим пересчетом на ее сухой вес. Односуточную культуру (начало стационарной фазы роста) центрифугировали и отмытые изотоническим раствором клетки использовали для полимеризации.

На полимеризацию брали 6 мл суспензии с требуемым содержанием биомассы в 1 мл (в пересчете на вес сухой биомассы), прибавляли 11 мл водного раствора 0,11 г N',N'-метиленабисакриламида и 1,9 г акриламида, 5 капель N',N',N',N'-тетраметилэтилендиамина и 3 мл 0,5% персульфата аммония. Полимеризацию проводили или в атмосфере аргона, или на воздухе при 10–12°. Образовавшийся гель протирали через металлическое сито с размерами пор 1–2 мм. Полученные гранулы отмывали декантацией (10×600 мл изотонического раствора: 0,78 г NaCl в 1 л воды) и 2 раза по 600 мл фосфатным буфером, pH 5,9 (2×600 мл). Отмытые гранулы суспендировали в 100 мл фосфатного буфера, помещали в колбу на 500 мл и вносили от 20 до 100 мг секодиона (I) в 0,5–2 мл этанола. Трансформацию проводили при 28° на качалках (120 или 220 об/мин). Пробы (по 10 мл), отбираемые через 2, 24, 48 ч, экстрагировали (3×20 мл) хлороформом. Экстракт упаривали, растворяли в 0,2 мл ацетона и 1 мкл раствора анализировали с помощью ГЖХ (колонка 4×1200 мм, заполненная хроматоном N-AW DMCS, 70–90 меш, с 2% неопентилгликольсукцинатом, температура 220°, скорость газа-носителя 120 мл/мин, хроматограф Рус-Ар). Качественный контроль за ходом процесса осуществляли ТСХ на силуфоле, в системе бензол — эфир (1 : 1), пятна веществ видны в УФ-свете.

*Восстановление метилового эфира секодиона (I), препаративный опыт.* Культуру *S. cerevisiae* ВКМу-488 выращивали на пивном сусле (общий объем культуральной жидкости 5 л). Биомассу собирали центрифугированием и суспендировали в 300 мл фосфатного буфера (pH 6,0). Из этой биомассы готовили гель по способу, описанному выше. Гранулы, полученные от каждого блока (20 мл), помещали в колбу на 500 мл, добавляли 100 мл буфера и 22,5 мг секодиона (I) в 0,5 мл этанола (всего было внесено 1,125 г субстрата) и вели процесс, как описано выше. Через 48 ч содержимое всех колб объединяли, многократно экстрагировали эфиром (всего 10 л), эфирный экстракт упаривали и получили 1,5 г светло-желтого масла, которое разделяли с помощью препаративной ТСХ на пластинках с незакрепленным слоем Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (IV ст. акт.) в системе бензол — эфир (2 : 3) (обнаружение парами иода). Выделяли 750 мг секокетола (II) в виде масла, закристаллизовавшегося при растирании с метанолом. Аналитический образец кристаллизовали из смеси метанол — этилацетат (1 : 1), т. пл. 112–113°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> —39° (с 0,08, диоксан). Литературные данные [15]: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> —39°, т. пл. 112–113°.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chibata I., Tosa T., Sato T. (1974) Appl. Mikrobiol., 27, 878–885.
2. Мандель М. О., Кестнер А. И. (1974) Тезисы симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», с. 79–80, Таллин.
3. Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Yamamoto K. (1974) Enzym. Engin., 2, 303–315.
4. Dinelli D. (1972) Proc. Biochem., 7, 9–12.

\* Б° — единица крепости сусла по Валингу.

5. Скрябин Г. К., Кошеченко К. А., Могильницкий Г. М., Суровцев В. И., Тюрин В. С., Фихте Б. А. (1974) Изв. АН СССР. Сер. биол., 6, 857-866.
6. Кошеченко К. А., Краснова Л. А., Гарсиа-Родригес Л. К., Суровцев В. И., Скрябин Г. К. (1976) Прикл. биохим. и микробиол., 12, 322-326.
7. Ананченко С. Н., Леонов В. Н., Платонова А. В., Торгов И. В. (1960) Докл. АН СССР, 135, 73-76.
8. Гулая В. Е., Крютченко Е. Г., Раттэль Н. Н., Мессинова О. В., Ананченко С. Н., Торгов И. В. (1975) Прикл. биохим. и микробиол., 11, 657-661.
9. Гулая В. Е., Кошеченко К. А., Ананченко С. Н., Торгов И. В., Скрябин Г. К. (1975) V съезд Всес. микробиол. о-ва (Ереван), Тезисы докладов, с. 246.
10. Martin C. K. A., Perlman D. (1976) Biotechn. and Bioeng., XVIII, 217-223.
11. Tosa T., Sato T., Mori T., Chibata I. (1974) Appl. Microbiol., 27, 886-889.
12. Kinoshita S., Muranaka M., Okada H. (1975) J. Ferment. Technol., 53, 223-229.
13. Talalay P. (1965) Ann. Rev. biochem., 34, 347.
14. Lefebvre Y., Po L., Watanabe M. (1976) J. steroid biochem., 7, 535-538.
15. Kosmol H., Kieslich K. I., Vössing R., Koch H. I., Gibian H. (1967) Liebigs Ann. Chem., 701, 199.
16. Кошеченко К. А., Бычкова Г. Г., Гулевская С. А., Луста К. А., Гулая В. Е., Ананченко С. Н. (1978) Изв. АН СССР. Сер. биол., 6, 862-871.

Поступила в редакцию  
18.VIII.1978

После доработки  
4.XII.1978

**APPLICATION OF IMMOBILIZED CELLS OF  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE VKMu-488 FOR ASYMMETRIC  
REDUCTION OF 3-METHOXY,  $\Delta^{1,3,5(10),9(11)-8,14}$ -SECOESTRATETRAEN-14,17-DIONE**

GULAYA V. E., ANANCHENKO S. N., TORGOV I. V.,  
KOSHCHENKO K. A., BYCHKOVA G. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry  
and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

The preparation and characteristics of acrylamide gel immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* VKMu-488 and the possibility of their application for obtaining optically active 3-methoxy,  $\Delta^{1,3,5(10),9(11)-8,14}$ -secoestratetraen-17 $\beta$ -ol, 14-one have been described. The optimal immobilization conditions were found to be as follows: 10% gel at 95:5,5 acrylamide - N,N-methylenebisacrylamide weight ratio, polymerization temperature of 5-12°, biomass 30-50 mg/ml, granule diameter of 1-2 mm, use of the induced culture at the end of the logarithmic phase. Optically active 3-methoxy,  $\Delta^{1,3,5(10),9(11)-8,14}$ -secoestratetraen-3,17 $\beta$ -diol, 14-one was obtained in 85-90% yield in batch system under the following conditions: 28° C, pH 6.0, substrate and biomass concentrations 1 g/l and 6 g/l, respectively. The stability of the immobilized cells was increased 30-fold by their single incubation in nutrition medium.