МИКРОБИОЛОГИЯ, 2023, том 92, № 2, с. 184–196

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

RHODOCOCCUS RHODOCHROUS ИЭГМ 1360 – ЭФФЕКТИВНЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР С3 ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНАНОВЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ[1]

© 2023 г. Н. А. Лучникова[a, b, *], Е. В. Тарасова[a, b], В. В. Гришко[c], И. Б. Ившина[a, b]

[a] *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия*

[b] *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия*

[c] *Институт технической химии УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614013 Россия*

**e-mail: luchnikova.n@mail.ru*

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.
После доработки 27.11.2022 г.
Принята к публикации 29.11.2022 г.

В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия С3 окислительной биотрансформации 1.0 г/л пентациклических тритерпеноидов олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот с использованием нерастущих клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. Наибольшую каталитическую активность по отношению к ОК и ГК проявляли суспензии нерастущих клеток с $ОП_{600}$ 2.6 в буфере pH 8.0 и $ОП_{600}$ 2.2 в буфере pH 6.0, что обеспечивало образование 61 и 100% 3-оксо-производных соответственно. С использованием фазово-контрастной, атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии выявлена ответная реакция родококков на воздействие ОК и ГК. *In silico* предположена апоптическая и антиоксидантная активность 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК соответственно. *In vitro* показана выраженная антибактериальная активность 3-оксо-ОК в отношении тест-культур *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Отсутствие токсического действия тритерпеноидов и их 3-оксо-производных на водные и растительные объекты продемонстрировано *in silico* и *in vitro* соответственно.

Ключевые слова: биотрансформация, глицирретовая кислота, олеаноловая кислота, нерастущие клетки, *Rhodococcus rhodochrous*, биологическая активность метаболитов

DOI: 10.31857/S0026365622600742, **EDN:** AVNRKP

На фоне высокой востребованности эффективных фармакологических средств для лечения социально-значимых заболеваний актуальной задачей является синтез новых химических соединений с потенциальной биологической активностью, в том числе на основе растительных терпеноидов (Calixto, 2019). Одной из интенсивно разрабатываемых в данной сфере групп соединений являются растительные пентациклические тритерпеноиды олеананового ряда, в частности олеаноловая (ОК, **1**, 3β-гидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота) и глицирретовая (ГК, **3**, 3β-гидрокси-11-оксо-олеан-12-ен-30-овая кислота) кислоты (Kumar, Dubey, 2019). ОК и ГК активно используются для получения полусинтетических производных с выраженной противовирусной, противомикробной, противовоспалительной, противоопухолевой и гепатопротективной активностью (Capel et al., 2011; Yu et al., 2013; Yan et al., 2018; Alho et al., 2019; Luchnikova et al., 2020). В настоящее время конверсия этих тритерпеноидов в основном осуществляется с помощью методов химического синтеза в условиях экстремальных показателей кислотности и температуры, часто с использованием 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. По сравнению с традиционным органическим синтезом, применение ферментов и целых клеток микроорганизмов для получения целевых соединений технологически перспективно. Это обусловлено их исключительной хемо- и стереоселективностью, широким кругом метаболизируемых субстратов, отсутствием проблемы минимизации побочных реакций

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600742 для авторизованных пользователей.

или необходимости в многочисленных стадиях защиты и снятия защитных групп, а также, что немаловажно, устойчивой активностью в экстремальных условиях внешней среды. Подавляющая часть процессов биологической трансформации ОК и ГК осуществляется с помощью мицелиальных грибов (Capel et al., 2011; Martinez et al., 2013; Gong et al., 2014; Wu et al., 2018), использование которых технологически нецелесообразно и небезопасно вследствие мицелиального характера их роста и способности к выработке микотоксинов. Примеры бактериальной трансформации ОК и ГК единичны и включают процессы, катализируемые представителями родов *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, проявляющими целевую трансформирующую активность при концентрации тритерпеноидов в среде не более 0.3 г/л (Ludwig et al., 2015; Xu et al., 2017, 2020). Ранее нами был описан непатогенный штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360, катализирующий направленную трансформацию 1.0 г/л ОК и ГК в течение 7 сут (Лучникова и соавт., 2021; Luchnikova et al., 2022).

Одним из эффективных подходов к интенсификации процессов биоконверсии сложных гидрофобных соединений является применение нерастущих клеток – бактериальных клеток в стационарной фазе роста, отмытых от источников питания и ресуспендированных в буферном растворе (Grishko et al., 2013; Ivshina et al., 2015; Nawawi et al., 2016; Иванова и соавт., 2022). 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 буферного раствора позволяет снизить риск бактериального загрязнения, ограничить рост посторонней микрофлоры и облегчить процесс выделения метаболитов. Ранее нами уже были продемонстрированы примеры успешной интенсификации процессов биотрансформации других растительных терпеноидов – бетулина и дегидроабиетиновой кислоты (Grishko et al., 2013; Иванова и соавт., 2022).

Цель настоящей работы – изучение эффективности использования нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 для возможного усиления процесса биотрансформации ОК и ГК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция. Объектом исследования служил штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 – активный биотрансформатор ОК и ГК из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ; номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, УНУ 73559, ЦКП 480868, http://www.iegmcol.ru), выделенный из ризосферы мха (бухта Тихая, остров Гукера, Земля Франца-Иосифа, Архангельская область, Россия). Полный геном штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 секвенирован и представлен в базе данных NCBI под номером JAJNCN000000000.1.

Химические реагенты. В экспериментах использовали ОК (CAS 508-02-1) (“Acros Organics”, США) и ГК (CAS 471-53-4) (“TCI”, Бельгия) высокой (≥97%) степени чистоты. Химические реагенты, в том числе ацетонитрил, диметилсульфоксид (ДМСО), метанол, хлороформ, этилацетат, *н*-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).

Определение растворимости ОК и ГК. Степень растворимости тритерпеноидов изучали микрометодом серийных двукратных разведений с использованием 96-луночных круглодонных полистироловых планшетов. В лунки вносили по 100 мкл фосфатно-щелочного буфера pH 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0. В первую лунку каждого ряда добавляли по 10 мг ОК или ГК, растворенных в 100 мкл ДМСО, смесь тщательно перемешивали, затем отбирали 100 мкл полученного раствора и переносили в следующую лунку. Процедуру повторяли до образования серии двукратных разведений. Концентрация ОК или ГК в одном ряду снижалась от 0.5 г/л до 0.003907 г/л. Растворимость определяли как концентрацию, при которой $ОП_{630}$ экспериментального раствора ОК или ГК была сравнима с $ОП_{630}$ контрольного буфера (спектрофотометр Multiscan Ascent, “Thermo Electron Corporation”, Финляндия).

Получение суспензий нерастущих клеток. Родококки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 48 ч. В стационарной фазе роста бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3000 об./мин, Hermle Z 200 A, Германия) в течение 10 мин и трижды промывали эквивалентным объемом фосфатно-щелочного буфера (pH 7.0). Отмытые клетки ресуспендировали в 25 мл фосфатно-щелочного буфера по Кларку–Лабсу с различным соотношением 0.1 M KH_2PO_4 и 0.1 M NaOH (pH 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0) (Dawson et al., 1986) и доводили оптическую плотность суспензий до значений $ОП_{600}$ 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.

Условия биотрансформации. Эксперименты проводили в условиях постоянного перемешивания на орбитальном шейкере Certomat IS (“Sartorius”, Германия) при 28°C и 160 об./мин. ОК и ГК растворяли в ДМСО (1 мг : 10 мкл) и вносили в

концентрации 1.0 г/л. В качестве биотического контроля выступала суспензия нерастущих клеток без тритерпеноидов, в качестве абиотического контроля – буферный раствор с тритерпеноидами.

Фазово-контрастная микроскопия. Визуализацию и измерение размеров клеток осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 ("Carl Zeiss", Германия), оснащенного фотокамерой Axiocam 506 Color в режиме фазового контраста с увеличением ×1000. Объем (V) и площадь (S) клеток рассчитывали по формулам (1) и (2) (Neumann et al., 2005):

$$V = r^2\pi h; \quad (1)$$

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

где r – 1/2 ширины клетки; π – 3.14; h – длина клетки.

Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Для получения изображений бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 ("Olympus Corporation", Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D ("Asylum Research", США), каплю (15–20 мкл) клеточной суспензии помещали на покровное стекло, смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя Live/Dead® *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit ("Invitrogen", США) и подсушивали при комнатной температуре в темноте в течение 10–15 мин. Препарат промывали деионизованной водой и сканировали с помощью КЛСМ. Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя Live/Dead®, применяли соответственно, аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром. 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 6/22A ("Wave Metrics", США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0.5–4.4 Н/м.

Качественный и количественный анализ ОК, ГК и их производных. Для экстракции остаточного содержания ОК, ГК и продуктов биотрансформации постферментационную среду с клетками подкисляли 10%-ным раствором HCl до pH 3.0–4.0 и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные этилацетатные экстракты последовательно промывали 1%-ым раствором Na_2CO_3 и дистиллированной водой (до pH 7.0). Полученный экстракт обезвоживали над Na_2SO_4, растворитель удаляли с помощью роторного испарителя Laborota 4000 ("Heidolph", Германия). Качественную оценку этилацетатных экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *н*-гексан–этилацетат (1 : 1 или 4 : 1, об./об.) на пластинках Alugram® Xtra SIL G/UV254 ("Macherey-Nagel", Германия); детекцию соединений – путем обработки пластинок 15% H_2SO_4 с последующим нагреванием при температуре 100–120°C в течение 2–3 мин.

Качественный анализ экстрактов и оценку динамики образования продукта трансформации ГК осуществляли методом газовой хромато-масс спектрометрии (ГХ-МС) с помощью газового хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890B/5977B ("Agilent Technology", США) с колонкой 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 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)диазометаном ("Sigma-Aldrich", США). Полученные масс-спектры сравнивали с известными масс-спектрами из библиотеки NIST08 MS Library.

Динамику образования продукта трансформации ОК оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращено-фазовой колонкой 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–деионизованная вода в процентном соотношении 80 : 20 (об./об.). Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл. Пробы предварительно растворяли в изопропаноле (ос. ч., "Криохром", Россия). Расчет концентраций ОК и продукта конверсии производили на основании уравнения (3), составленного по калибровочной кривой зависимости концентрации аналитического метчика ОК от площади пиков.

$$y = 7E - 06x - 1.2389, \quad (3)$$

где x – площадь пика, mAU, y – концентрация, %.

Выделение и идентификация продуктов трансформации ОК и ГК. Первичную идентификацию продуктов биотрансформации проводили путем сравнения масс-спектров метиловых эфиров по-

лученных соединений (дополнительные материалы, рис. S1) с масс-спектрами метиловых эфиров известных соединений из библиотеки NIST08 Mass Spectral Library (ГХ-МС (*m/z*): 3-оксо-ОК 468.3 (M+); 3-оксо-ГК 482.4 (M+)). Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектра исследуемого вещества с библиотечным с коэффициентом подобия, превышающим 90%. Подтверждение структуры продуктов трансформации проводили с использованием ЯМР-спектроскопии. Спектры ^{1}H, ^{13}C и DEPT ЯМР регистрировали с использованием ЯМР-спектрометра Bruker AVANCE II (“Bruker BioSpin GmbH”, Германия) при частоте 400 и 100 МГц соответственно (дополнительные материалы, рис. S2, S3). В качестве растворителя использовали $CDCl_3$. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 (“Perkin Elmer”, США) при длине волны 589 нм для растворов в $CHCl_3$. Точку плавления регистрировали с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 (“Stanford Research Systems”, США) со скоростью нагрева 1°C/мин.

Экстракт (190.5 мг), полученный в процессе биотрансформации ОК нерастущими клетками *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 114.4 мг соединения **2** и 40.2 мг остаточной ОК. Перекристаллизацию соединения **2** проводили в системе изопропанол–хлороформ (3 : 1, об./об.).

3-Оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота (**2**). Белый порошок, $T_{плав}$ 202.6°C (лит.: 167–169°C (Maldonado et al., 2015)), R_f 0.45 (*н*-гексан–этилацетат 1 : 1, об./об.), $[\alpha]_D^{20} = +38.8°$ (*c* 0.5, $CHCl_3$) (лит.: $[\alpha]_D^{25} = +73.6°$ (*c* 0.26, $CHCl_3$) (Ma et al., 2002); $[\alpha]_D = +93.5°$ (*c* 0.23, $CHCl_3$) (Maldonado et al., 2015)). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, δ, ppm, J/Hz): 5.30 (1H, H-12); 2.85 (1 H, dd, $J = 4.0, 16.0$ Hz); 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, $7CH_3$). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$, δ, 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.

Экстракт (180.9 мг), полученный в процессе биотрансформации ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, 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). В качестве элюента использовали смесь хлороформ–изопропанол с градиентом концентраций от 100 : 0 до 99 : 1 (об./об.). При разделении получали 145.5 мг соединения **4**. Перекристаллизацию соединения **4** проводили в системе изопропанол–хлороформ (3 : 1, об./об.).

3,11-Диоксо-олеан-12-ен-30-овая кислота (**4**). Белый порошок, $T_{плав}$ 274.4°C (лит.: 311–313°C (Beseda et al., 2010)), R_f 0.45 (*н*-гексан : этилацетат 4 : 1, об./об.), $[\alpha]_D^{20} = +218.2°$ (*c* 0.5, $CHCl_3$) (лит.: $[\alpha]_D^{20} = +184.5$ (*c* 0.4, $CHCl_3$) (Beseda et al., 2010)). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, δ, ppm, J/Hz): 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, $J = 4.0, 16.0$ Hz); 1.37; 1.27; 1.22; 1.17; 1.10; 1.06; 0.85 (каждый 3H, 7s, $7CH_3$). ^{13}C ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$, δ, 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 (2C); 23.34; 21.43; 18.83; 18.56; 15.61.

***In silico* анализ ОК, ГК и их производных.** Экотоксичность и растворимость ОК, ГК и их производных рассчитывали с помощью компьютеризированной прогностической системы 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 анализа структурно-функциональных взаимосвязей в молекулах.

Оценку 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 1.

Определение фитотоксичности ОК, ГК и их производных. 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, полу-

ченными в результате 3 сут процесса биотрансформации ОК и ГК. Степень фитотоксичности определяли по истечении 7 сут по величине эффекта торможения роста корневой системы по формуле (4):

$$E_T = (L_K - L_{ОП})/L_K \times 100\%, \quad (4)$$

где E_T – эффект торможения, %; $L_{ОП}$ – средняя длина корней в опыте, см; L_K – средняя длина корней в контроле, см.

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

Определение антимикробной активности ОК, ГК и их производных. 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 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022) с использованием 96-луночных полистироловых 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 (2×10^6 кл./мл). Планшеты выдерживали при оптимальной для тест-культур температуре 28 или 37°C в течение 24 ч. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали путем окрашивания йодонитротетрозолия хлоридом. Образование нерастворимого формазана и соответствующего пурпурного окрашивания свидетельствовало о наличии в лунках активно респирирующих клеток. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

Статическая обработка данных. Эксперименты проводили в трех-, пяти- или десятикратной повторности. Для статистического анализа данных использовали программу STATISTICA (StatSoft Россия, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотрансформация ОК и ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Ранее нами было показано (Лучникова и соавт., 2021), что в ростовых условиях штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 катализировал направленную конверсию 1.0 г/л ОК и ГК с образованием 0.9 и 26% 3-оксо-производных в течение 7 сут соответственно (рис. 1). В рамках данного исследования изучено влияние кислотности буферного раствора и количества биомассы нерастущих клеток на процесс биотрансформации тритерпеноидов. Известно, что родококки способны выживать при экстремальных значениях pH от 1.0 до 11.0, при этом оптимальными являются нейтральные значения pH (Pátek et al., 2021). По нашим данным, среди протестированных условий кислотности только использование буферных растворов с pH 8.0 и 6.0 способствовало значительному сокращению (до 3 сут) продолжительности процесса биотрансформации ОК и ГК с образованием 14 и 31% окисленных производных соответственно (данные не представлены).

Одним из преимуществ использования нерастущих клеток является возможность строгого регулирования количества исходной биомассы на протяжении всего процесса биотрансформации. Отсутствие активного роста родококков в процессе конверсии ОК и ГК подтверждено путем измерения оптической плотности суспензий нерастущих клеток ($ОП_{600}$), которая статистически значимо не изменялась в течение всего эксперимента (рис. 2). Повышение $ОП_{600}$ клеточной суспензии (рис. 2; 0 сут) по сравнению с биотическим контролем связано с внесением гидрофобных ОК или ГК в трансформационную среду.

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; Иванова и соавт., 2022). Полученные нами данные по биотрансформации ОК и ГК подтвердили выявленную ранее зависимость (рис. 3). Установлено, что конверсия ОК происходит наиболее эффективно (выход производного 61%) при использовании суспензии с $ОП_{600}$ 2.6 (концентрация клеток 19 г/л), тогда как конверсия ГК (выход производного 100%) – при использовании суспензии с $ОП_{600}$ 2.2 (концентрация клеток 13 г/л). Тот факт, что для более эффективной биоконверсии ГК, по сравнению с ОК, необходимо меньшее количество клеток на единицу субстрата, по-видимому, связан с повышенной устойчивостью бактериальных клеток к данному тритерпеноиду. Стоит отметить, что последующее увеличение количества биомассы до $ОП_{600}$ 2.8 (концентрация клеток 31 г/л; рис. 3) приводило к снижению выхода производных, 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 при увеличении плотности биомассы клеток и перераспределением субстрата в буферной системе.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов показано, что наиболее эффективная

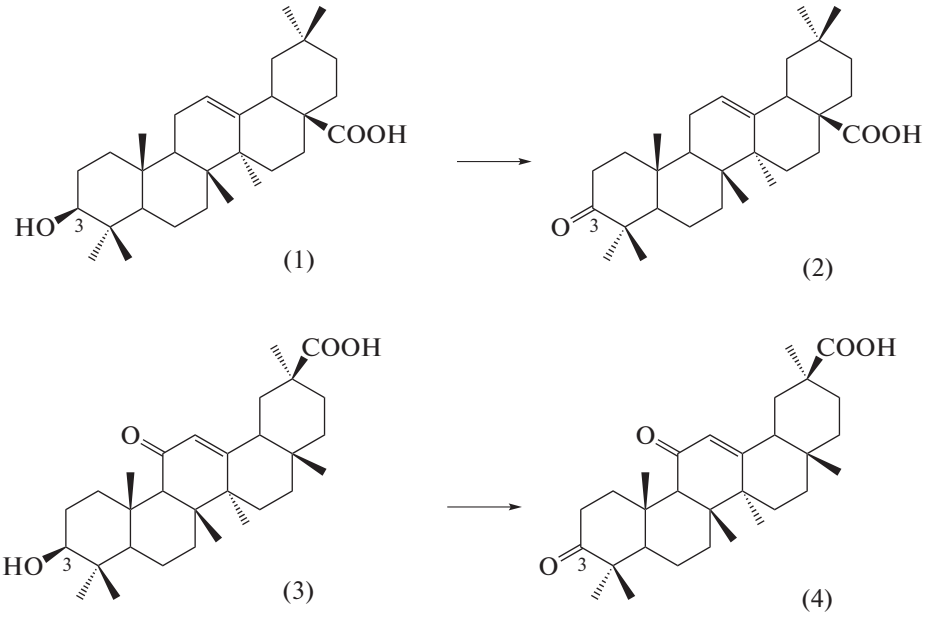

Рис. 1. Схема биотрансформации ОК (1) и ГК (3) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с образованием 3-оксо-ОК (2) и 3-оксо-ГК (4) соответственно.

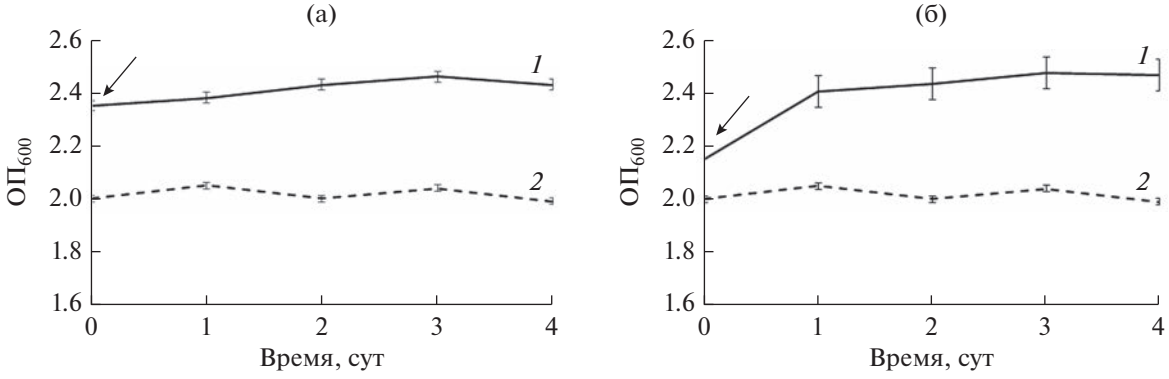

Рис. 2. Изменение оптической плотности ($ОП_{600}$) суспензии нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации (*1*): ОК (а) и ГК (б); (*2*) – биотический контроль. Стрелками обозначено внесение ОК и ГК.

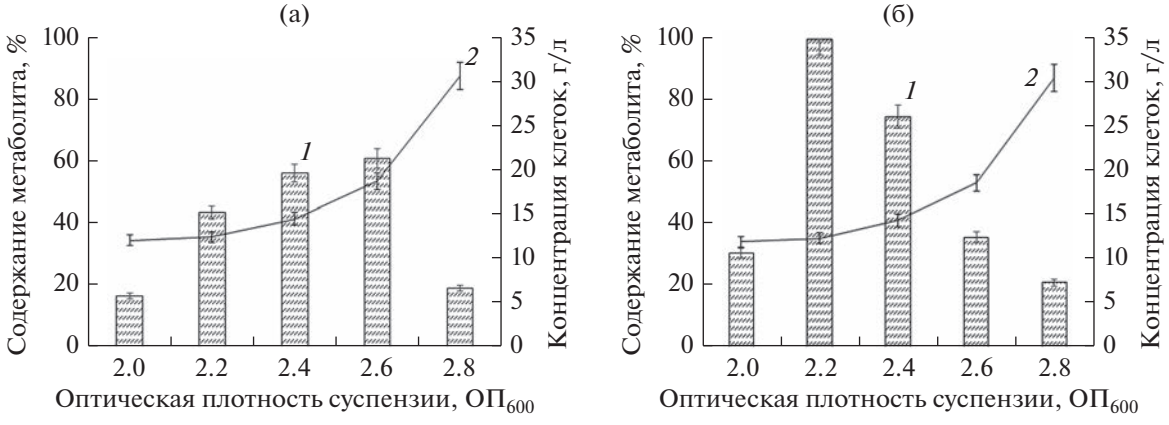

Рис. 3. Зависимость образования (*1*) 3-оксо-ОК (а) и 3-оксо-ГК (б) от количества биомассы нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (*2*) в буферах pH 8.0 (а) и pH 6.0 (б). Приведены данные 3 сут процесса биотрансформации.

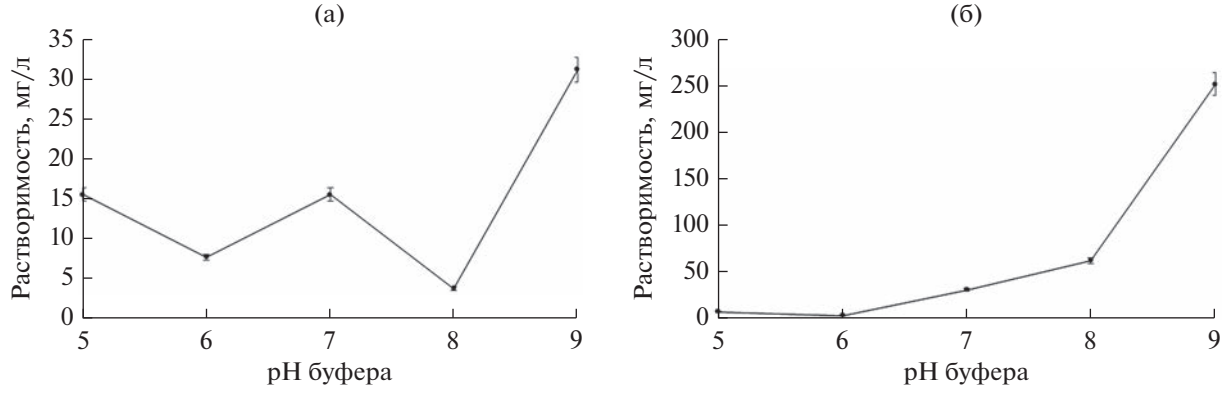

Рис. 4. Растворимость ОК (а) и ГК (б) в буферных растворах с различной pH.

конверсия ОК и ГК обеспечивается с использованием суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с $ОП_{600}$ 2.6 в буфере pH 8.0 и $ОП_{600}$ 2.2 в буфере pH 6.0 соответственно (дополнительные материалы, рис. S4).

Влияние ОК и ГК на нерастущие клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Следует отметить, что ОК обладает более низкой растворимостью в буфере pH 8.0 (4 мг/л) по сравнению с буферами pH 5.0; 6.0; 7.0; 9.0, а ГК – в буфере pH 6.0 (4 мг/л) по сравнению с буферами pH 5.0; 7.0; 8.0; 9.0 (рис. 4). Возможно, высокая каталитическая активность бактериальных клеток в отношении ОК и ГК в условиях использования буферов pH 8.0 и pH 6.0 соответственно обусловлена характером взаимодействия родококков с кристаллическим субстратом, а именно возможностью образования агрегатов на поверхности частиц ОК и ГК. По данным Atrat et al. (1991), механизм взаимодействия клеток *Mycobacterium fortuitum* с частицами ситостерола характеризовался так называемой "иммобилизацией клеток на частицах субстрата", образованием стабильных многоклеточных агломератов 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 трансформации и транспорта в клетку (Atrat et al., 1991). Известно, что актинобактерии, 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; Иванова и соавт., 2022). Если предположить, что трансформация ОК и ГК родококками протекает аналогичным образом, то высокая каталитическая активность по отношению к кристаллическим частицам ОК и ГК может быть обусловлена образованием многокомпонентной подвижной мезофазы или биосурфактантов, детектируемых с использованием АСМ и совмещенного АСМ-КЛСМ сканирования (рис. 5).

Проведение морфометрических исследований позволило выявить, что воздействие ОК на нерастущие клетки, в отличие от активно растущей культуры (Лучникова и соавт., 2021; Luchnikova et al., 2022), индуцировало снижение соотношения площади поверхности клеток к их объему и повышение шероховатости клеточной стенки (табл. 1). Повышение степени шероховатости клеточной поверхности может являться следствием секреции внеклеточных полимеров (см. рис. 5) и изменения липидного состава клеточной стенки, что повышает Ван-дер-Ваальсовы силы, способствующие лучшей адгезии клеток к субстрату (Uzoechi, Abu-Lail, 2019). По-видимому, выявленные изменения морфометрических показателей обеспечивают более эффективный контакт клеток с субстратом и тем самым обусловливают повышенный уровень его биоконверсии.

Определение биоактивности и токсичности производных ОК и ГК. Известно, что 3-оксо-ОК обладает выраженным *in vivo* антимеланомным (Huang et al., 2006) и *in vitro* антилейшманийным и антитрипаносомным действием (Funari et al., 2016). Тогда как 3-оксо-ГК *in vitro* проявляет ингибирующую активность в отношении липоксигеназ, продукты биосинтеза которых могут способствовать развитию воспалительных, аутоиммунных заболеваний, бронхиальной астмы и рака (Choudhary et al., 2009). Методом *in silico* молекулярного докинга документирована потенциальная ингиби-

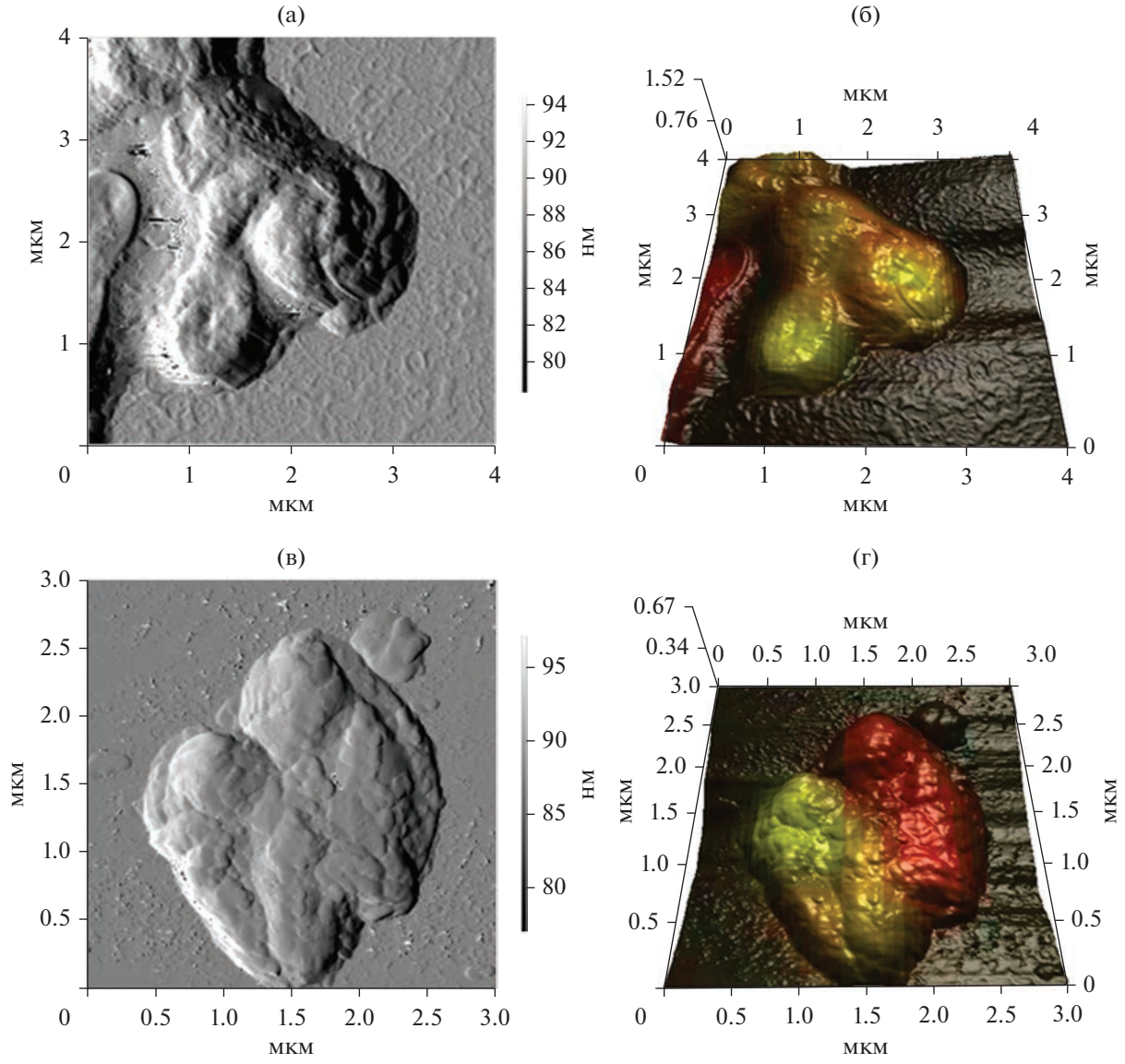

Рис. 5. АСМ и совмещенные АСМ-КЛСМ изображения нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в присутствии ОК (а, б) и ГК (в, г).

Таблица 1. Морфометрические показатели нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360

Условия	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь, мкм^2	Объем, мкм^3	Относительная площадь, мкм$^{-1}$	Шероховатость, нм
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

* Данные достоверно ($p < 0.05$) отличаются от контрольных значений.

Таблица 2. Прогнозируемая биологическая активность ОК, ГК и их производных

Предполагаемая активность	ОК		3-оксо-ОК		ГК		3-оксо-ГК	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
Агонист апоптоза	–	–	**0.822**	0.007	0.878	0.005	0.896	0.004
Стимулятор фактора 2, связанный с NF-E2	–	–	–	–	–	–	**0.726**	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

Таблица 3. Антимикробная активность (МПК, мг/мл) ОК, ГК и их производных

Соединение	Микроорганизм			
	Micrococcus luteus NCIMB 196	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Bacillus subtilis* ATCC 6633
ОК	12.5	>100	>100	12.5
3-Оксо-ОК	3.125	12.5	50	0.098
ГК	>100	25	>100	0.195
3-Оксо-ГК	>100	25	>100	50
Ампициллин	25	>100	>100	12.5
Канамицин	0.39	<0.024	>100	<0.024

рующая активность 3-оксо-ГК в отношении протеазы M^{pro} SARS-CoV-2 (Florez, Singh, 2020). В результате проведенных нами исследований потенциальной биоактивности соединений с использованием компьютерной программы PASS Online показано, 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 (табл. 2).

Ранее была показана ингибирующая активность нативных ОК и ГК в отношении патогенных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* соответственно (Duric et al., 2013; Kannan et al., 2019). Несмотря на то, что с использованием программы PASS Online нами не выявлен антимикробный потенциал в отношении 3-оксо-производных **3** и **4**, проведенное экспериментальное определение *in vitro* антимикробной активности полученных метаболитов показало, что процесс С3 окисления ОК способствует повышению ингибирующей активности в отношении патогенных бактерий *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *S. aureus* и *B. subtilis*, которая превосходит активность широко используемого антибиотика ампициллина (табл. 3).

Проведенный *in silico* анализ полученных 3-оксо-производных с использованием программы ECOSAR показал, что, по сравнению с исходными соединениями, данные тритерпеноиды могут обладать сниженной острой и хронической токсичностью по отношению к водным организмам (табл. 4). При этом как исходные ОК и ГК, так и их производные предположительно характеризуются крайне низкой растворимостью в воде.

Токсичность ОК, ГК и их метаболитов по отношению к растительным объектам определяли с использованием семян овса посевного. При измерении длины их корней после обработки исследуемыми соединениями статистически значимых различий, свидетельствующих о фитотоксическом эффекте, не было выявлено (табл. 5, рис. 6).

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные условия С3 окислительной биотрансформации ОК и ГК (1.0 г/л) с использованием нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Бактериальные суспензии с $ОП_{600}$ 2.6 в буфере pH 8.0 и с $ОП_{600}$ 2.2 в буфере pH 6.0 в течение 3 сут катализировали об-

Таблица 4. Прогнозируемая экотоксичность и растворимость ОК, ГК и их производных

Тест-объект (показатель, экспозиция)	Концентрация, мг/л			
	ОК	3-оксо-ОК	ГК	3-оксо-ГК
Растворимость в воде при 25°C	0.0018	0.0016	0.0023	0.0029
ECOSAR класс	Нейтральные органические вещества – кислоты	Нейтральные органические вещества – кислоты	Нейтральные органические вещества – кислоты	Винил/аллил кетоны – кислоты
Острая токсичность				
Рыбы ($ЛД_{50}$, 96 ч)	0.018	0.052	0.171	4.624
Дафнии ($ЛД_{50}$, 48 ч)	0.018	0.049	0.019	0.904
Зеленые водоросли ($ЭД_{50}$, 96 ч)	0.127	0.286	0.035	1.166
Хроническая токсичность				
Рыбы ($ЭД_{50}$, 30 сут)	0.003	0.009	0.004	0.260
Дафнии ($ЭД_{50}$, 21 сут)	0.008	0.019	0.010	0.319
Зеленые водоросли ($ЭД_{50}$, 16 сут)	0.112	0.227	0.131	1.976

Таблица 5. Фитотоксичность ОК, ГК и их производных

Условия	Средняя длина корня, мм	Фитоэффект, %
Абиотический контроль (вода)	40.49 ± 14.15	0
Контроль среды	38.24 ± 12.95	5.56
Биотический контроль	32.48 ± 12.43	19.78
ОК	31.12 ± 10.71	23.14
ГК	36.00 ± 14.67	11.09
Продукты биотрансформации ОК	41.39 ± 10.69	–2.23
Продукты биотрансформации ГК	30.90 ± 8.59	23.68

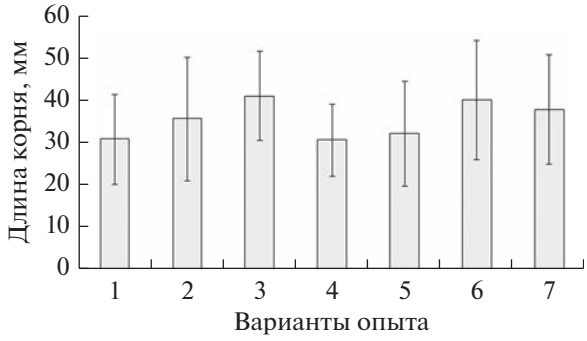

Рис. 6. Изменение длины корня овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием ОК, ГК и продуктов их трансформации: 1 – ОК, 2 – ГК, 3 – продукты биотрансформации ОК, 4 – продукты биотрансформации ГК, 5 – биотический контроль, 6 – абиотический контроль (вода), 7 – контроль среды.

разование 61% 3-оксо-ОК и 100% 3-оксо-ГК соответственно. В экспериментах *in silico* и *in vitro* показана безопасность полученных производных по отношению к водным и растительным объектам соответственно. В экспериментах *in vitro* документировано выраженное антибактериальное действие 3-оксо-ОК. Полученные данные расширяют представление о каталитическом потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и возможности их использования для направленной конверсии сложных гидрофобных соединений с целью получения биологически активных производных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллек-

ция алканотрофных микроорганизмов" и "Исследование материалов и веществ" Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90104) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание АААА-А19-119112290008-4, 122010800029-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Иванова К.М., Гришко В.В., Ившина И.Б. Высокоэффективная биодеструкция экотоксичной дегидроабиетиновой кислоты нерастущими клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107 // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 419–432.
https://doi.org/10.31857/S002636562230022X

Ivanova K.M., Grishko V.V., Ivshina I.B. Highly efficient biodegradation of ecotoxic dehydroabietic acid by resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107 // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 364–377.

Лучникова Н.А., Иванова К.М., Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биоконверсия тритерпеноидов олеананового типа актинобактериями. IX Информационная школа молодого ученого. Россия. Екатеринбург. 2021. Сборник научных трудов. С. 15–26.
https://doi.org/10.32460/ishmu-2021-9-0002

Alho D.P.S., Salvador J.A.R., Cascante M., Marin S. Synthesis and antiproliferative activity of novel heterocyclic glycyrrhetinic acid derivatives // Molecules. 2019. V. 24. Art. 766.
https://doi.org/10.3390/molecules24040766

Atrat P., Hosel P., Richter W., Meyer H.W., Horhold C. Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles // J. Basic Microbiol. 1991. V. 31. P. 413–422.
https://doi.org/10.1002/jobm.3620310605

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 glycyrrhetinic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 433–454.
https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.036

Calixto J.B. The role of natural products in modern drug discovery // An. Acad. Bras. Cienc. 2019. V. 91. e20190105.
https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105

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 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 38. P. 1493–1498.
https://doi.org/10.1007/s10295-010-0935-y

Cheremnykh K.M., Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus* actinobacteria // J. Hazard. Mater. 2018. V. 346. P. 103–112.
https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.025

Choudhary M.I., Siddiqui Z.S., Nawaz S.A. Microbial transformation of 18β-glycyrrhetinic acid by *Cunninghamella elegans* and *Fusarium lini*, and lipoxygenase inhibitory activity of transformed products // Nat. Prod. Res. 2009. V. 23. P. 507–513.
https://doi.org/10.1080/14786410500463536

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100. 32nd edn. Malvern: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022. 362 p.

Dawson R. Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research. 3rd edn. Oxford: Oxford University Press, 1986. 580 p.

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 // J. Plant Stud. 2013. V. 2. № 2. P. 61–70.
https://doi.org/10.5539/jps.v2n2p61

Funari C.S., de Almeida L., Passalaqua T.G., Martinez I., Ambrosio 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 Amazon. 2016. V. 46. P. 411–416.
https://doi.org/10.1590/1809-4392201600204

Gong T., Zheng L., Zhen X., He H.X., Zhu H.X., Zhu P. Microbial transformation of oleanolic acid by *Trichothecium roseum* // J. Asian Nat. Prod. Res. 2014. V. 16. P. 383–386.
https://doi.org/10.1080/10286020.2014.884564

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 Biochem. 2013. V. 48. P. 1640–1644.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.012

Huang D., Ding Y., Li Y., Zhang W., Fang W., Chen X. Antitumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid // Cancer Lett. 2006. V. 233. P. 289–296.
https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.019

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 J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 711–717.
https://doi.org/10.1023/A:1008885309221

Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.
https://doi.org/10.1007/s00284-014-0718-1

Kannan S., Sathasivam G., Marudhamuthu M. Decrease of growth, biofilm and secreted virulence in opportunistic

nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 by glycyrrhetinic acid // Microb. Pathog. 2019. V. 126. P. 332–342.
https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.026

Kumar D., Dubey K.K. Hybrid Approach for Transformation for Betulin (an Anti-HIV Molecule) / Eds. Gupta V., Pandey A. Amsterdam: Elsevier, 2019. P. 193–203.

Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids // Molecules. 2020. V. 25. Art. 5526.
https://doi.org/10.3390/molecules25235526

Luchnikova N.A., Grishko V.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanolic acid using *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 757 // Catalysts. 2022. V. 12. Art. 1352.
https://doi.org/10.3390/catal12111352

Ludwig B., Geib D., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Mufler K., Ulber R. Whole-cell biotransformation of oleanolic acid by free and immobilized cells of *Nocardia iowensis*: characterization of new metabolites // Eng. Life Sci. 2015. V. 15. P. 108–115.
https://doi.org/10.1002/elsc.201400121

Ma C., Nakamura N., Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization // Chem. Pharm. Bull. 2002. V. 48. P. 1681–1688.

Maldonado E., Amador S., Juárez-Jaimes V. Secondary metabolites from *Asclepias otarioides* // J. Mex. Chem. Soc. 2015. V. 59. P. 50–52.
https://doi.org/10.29356/jmcs.v59i1.14

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. V. 94. P. 229–237.
https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.011

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 J. Fundam. Appl. Life Sci. 2016. V. 6. P. 101–107.

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. V. 9. P. 163–168.
https://doi.org/10.1007/s00792-005-0431-x

Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // Biotechnol. Adv. 2021. Art. 107698.
https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107698

Singh S., Florez H. Bioinformatic study to discover natural molecules with activity against COVID-19 // F1000Research. 2020. V. 9. Art. 1203
https://doi.org/10.12688/f1000research.26731.1

Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // Process Biochem. 2017. V. 52. P. 1–9.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.003

Uzoechi S.C., Abu-Lail N.I. The effects of β-lactam antibiotics on surface modifications of multidrug-resistant *Escherichia coli*: a multiscale approach // Micros. Microanal. 2019. V. 25. P. 135–150.
https://doi.org/10.1017/S1431927618015696

Wu S.Y., Cui S.C., Wang L., Zhang Y.T., Yan X.X., Lu H.L., Xing G.Z., Ren J., Gong L.K. 18β-Glycyrrhetinic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway // Acta Pharmacol. Sin. 2018. V. 39. P. 1865–1873.
https://doi.org/10.1038/s41401-018-0110-y

Xu S.H., Chen H.L., Fan Y., Xu W., Zhang J. Application of tandem biotransformation for biosynthesis of new pentacyclic triterpenoid derivatives with neuroprotective effect // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2020. V. 30. Art. 126947.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126947

Xu S.H., Wang W.W., Zhang C., Liu X.F., Yu B.Y., Zhang J. Site-selective oxidation of unactivated C–H sp3 bonds of oleanane triterpenes by *Streptomyces griseus* ATCC 13273 // Tetrahedron. 2017. V. 73. P. 3086–3092.
https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.04.036

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 // Nat. Prod. Res. 2018. V. 33. P. 1849–1855.
https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1477150

Yu F., Wang Q., Zhang Z., Peng Y., Qiu Y., Shi Y., Zheng Y., Xiao S., 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 // J. Med. Chem. 2013. V. 56. P. 4300–4319.
https://doi.org/10.1021/jm301910a

Rhodococcus rhodochrous IEGM 1360, an Efficient Biocatalyst of C3 Oxidative Transformation of Oleanane Triterpenoids

N. A. Luchnikova[1, 2, *], E. V. Tarasova[1, 2], V. V. Grishko[3], and I. B. Ivshina[1, 2]

[1]*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

[2]*Perm State University, Perm, 614990 Russia*

[3]*Institute of Technical Chemistry, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614013 Russia*

**e-mail: luchnikova.n@mail.ru*

Received November 8, 2022; revised November 27, 2022; accepted November 29, 2022

Abstract—The optimal conditions for C3 oxidative biotransformation of 1.0 g/L pentacyclic triterpenoids oleanolic (OA) and glycyrrhetic (GA) acids were determined using the resting cells of *Rhodococcus rhodochrous*

IEGM 1360 from the Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms. Suspensions of the resting cells with OD_{600} 2.6 in pH 8.0 buffer and OD_{600} 2.2 in pH 6.0 buffer showed the highest catalytic activity against OA and GA, which ensured the formation of 61 and 100% of their 3-oxo derivatives, respectively. Using phase contrast, atomic force, and confocal laser scanning microscopy, an adaptive response of rhodococci to the effects of OA and GA was revealed. *In silico*, the apoptotic and antioxidant activities of 3-oxo-OA and 3-oxo-GA, respectively, have been assumed. In vitro, a pronounced antibacterial activity of 3-oxo-OA against *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* was shown. The absence of toxic effects of the triterpenoids and their 3-oxo derivatives on aquatic and plant objects was demonstrated *in silico* and *in vitro*, respectively.

Keywords: biotransformation, glycyrrhetic acid, oleanolic acid, resting cells, *Rhodococcus rhodochrous*, biological activity of metabolites