

УДК 579.222.4

ОДНОСТАДИЙНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM*

© 2024 г. Д. Н. Текучева^а, *, М. В. Карпов^а, В. В. Фокина^а, Т. И. Тимакова^а,
А. А. Шутов^а, М. В. Донова^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ “Пущинский научный центр
биологических исследований РАН”, Пущино, 142290, Россия

*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 26.10.2023 г.

Принята к опубликованию 28.10.2023 г.

Конститутивная гетерологическая экспрессия в штаммах *Mycolicibacterium neoaurum*, продуцентах ценных C₁₉-стероидов, генов, кодирующих грибную 17β-гидроксистероиддегидрогеназу (17β-ГСД), ответственную за восстановление кислородного заместителя в стероидном ядре по положению С-17, и микобактериальную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД), способствующую синтезу кофермента НАД(Ф)Н, необходимого для активности 17β-ГСД, позволило существенно повысить выход С-17 гидроксистероидов: тестостерона (Т) и 1(2)-дегидротестостерона (дТ). При этом рекомбинантные штаммы, созданные на основе *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и *M. neoaurum* NRRL В-3805 Δ *kstD*, накапливали преимущественно Т, а *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D – одновременно Т и дТ.

Ключевые слова: трансформация стероидов, тестостерон, фитостерин, миколицибактерии, гетерологическая экспрессия, целноклеточный катализ

DOI: 10.31857/S0026365624020033

Потребности мирового фармацевтического рынка в стероидных препаратах уступают первенство только антибиотикам (Fernandez-Cabezón et al., 2017). Тестостерон (Т, андрост-4-ен-17β-ол-3-он) и его производные применяются при эндокринных нарушениях и заболеваниях обмена веществ, таких как ожирение, недостаточность обмена белков, липидов, микро- и макроэлементов, возрастные изменения и другие.

Использование фитостероидов в биотехнологическом производстве стероидных синтонов и конечных субстанций обеспечивает снижение их себестоимости (Donova, 2017). Биотрансформацией фитостероидов получают ценные ключевые C₁₉-синтоны: андростендион (АД), андростадиендион (АДД), 9α-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9α-ОН-АД). Далее из АД и АДД возможно получать путем химического синтеза практически все фармацевтически ценные стероидные соединения, например, половые гормоны, включая тестостерон, а также гидрокортизон, минералокортикоиды и другие (García et al., 2012; Donova, 2023).

Быстрорастущие непатогенные актинобактерии рода *Mycolicibacterium* (*M. smegmatis*, *M. fortuitum* и *M. neoaurum*) способны окислять боковую цепь

стероидов и трансформировать стероидное ядро. Наличие в клеточной стенке миколовых кислот (Daffe et al., 1993) является крайне важным для обеспечения активного транспорта и биодоступности стероидов для ферментных систем клеток миколицибактерий. Для повышения выхода АД и АДД при биоконверсии фитостерина активно применяются мутантные и рекомбинантные штаммы рода *Mycolicibacterium* (Shao et al., 2019; Zhou et al., 2020).

3-кетостероид-Δ¹-дегидрогеназы (КстД) представляют собой флавоферменты, которые катализируют депротонирование C1(α) и C2(β) в стероидном кольце А, и являются ключевыми в превращении АД в АДД (van der Geize et al., 2000). Искусственным генетическим нокаутом ключевого гена *kstD* был создан штамм *M. neoaurum* NRRL В-3805 Δ *kstD* (Loraine, Smith, 2017). Делеция в гене *kstD* должна приводить к преимущественному накоплению АД в ходе каскадной реакции окисления алифатической цепи фито- и холестерина. Однонуклеотидная замена в гене *kstD* (Bragin et al., 2013) определяет преимущественное накопление АД штаммом Ас-1815D и, напротив, АДД штаммом Ас-1816D (Egorova et al., 2009; Tekucheva et al., 2022).

Биотехнологический способ получения Т в одну стадию в одном биореакторе является экологически и экономически более привлекательным по сравнению с многостадийными технологиями, включающими химический синтез. Создание среды культивирования, способствующей активному росту штамма *M. neoaurum* и дисперсному распределению слабо растворимого фитостерина, а также подбор оптимальных условий аэрации и режима внесения глюкозы, позволили существенно повысить выход Т (Tekucheva et al., 2022). Интенсивная аэрация способствует росту культуры и окислению боковой цепи фитостерина (Szentirmai, 1990), напротив, слабая аэрация способствует НАДН-зависимому процессу восстановления АД до Т (Tekucheva et al., 2022).

Основными стратегиями метаболической инженерии для повышения продуктивности и селективности трансформации стерина штаммами *Mycobacterium* являются: 1) блокировка метаболических путей деградации стероидного ядра и синтеза побочных продуктов (Пошехонцева и соавт., 2023); 2) введение новых или более эффективных ферментов целевых реакций (данная работа); 3) улучшение транспорта стероидов в клетку (He et al., 2018; Xiong et al., 2020); 4) оптимизация путей, не связанных с модификацией стероидов, но влияющих на регенерацию их коферментов (Su et al., 2018; данная работа), синтез АТФ (Zhou et al., 2020), уровень активных форм кислорода (Shao et al., 2019).

Известно 14 подтипов 17 β -ГСД суперсемейства короткоцепочечных дегидрогеназ-редуктаз (SDR), катализирующих обратимое окисление/восстановление заместителя в положении С-17 различных стероидов (Marchais-Oberwinkler et al., 2011). В геномах близкородственных штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D выявлен ген *hsd4A* (Bragin et al., 2013), являющийся ортологом гена из штамма *M. neoaurum* ATCC25795, кодирующего 17 β -гидроксистероиддегидрогеназу (17 β -ГСД). Микобактериальная 17 β -ГСД окисляет Т до АД и дТ до АДД (Xu et al., 2016). 17 β -оксостероид-редуктазная активность штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D является НАД(Н)-зависимой (Tekucheva et al., 2022).

Количественная оценка активности соответствующих ферментов позволила заключить, что гетерологичная коэкспрессия генов, кодирующих грибную 17 β -ГСД из штамма *Cochliobolus lunatus* и бактериальную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) из штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в клетках микобактерий является лучшей стратегией для получения штамма с повышенной 17-оксостероид-редуктазной-активностью (Karpov et al., 2019).

Целью настоящей работы являлось создание рекомбинантных штаммов *M. neoaurum*, трансформирующих фитостерин в высоких (5–20 г/л) концентрациях в тестостерон, на основе гетерологической

экспрессии генов, кодирующих эукариотическую 17 β -ГСД *C. lunatus* и бактериальную Г6ФД *M. tuberculosis* H37Rv, под конститутивным промотором *Phsp60* в составе бицистронной конструкции.

Реактивы. В работе использованы реактивы: фитостерин с общим содержанием стерина 95.47% (“Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co.”, Китай); дрожжевой экстракт (“Difco”, США); кукурузный экстракт (“Sigma”, Франция); соевый пептон (“Hi Media”, Индия); метилированный β -цикодекстрин W7 M1.8 (“Wacker Chemie”, Германия); Tween-80 (“Panreac”, Испания), полножирная соевая мука (ООО “Протеин-плюс”, Россия); агароза (“Invitrogen”, Великобритания); ДНК-модифицирующие ферменты и наборы для экстракции ДНК (“Thermo Fisher”, США); реагенты и колонки для препаративного выделения и очистки плазмидной ДНК (“QIAGEN”, США) и другие реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а.

Микроорганизмы, штаммы и условия культивирования. Штаммы *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ВКМ), *M. neoaurum* NRRL B-3805 Δ kstD (B-3805 D) – от доктора М. Смит (Университет Йорка, Великобритания) (Loraine, Smith, 2017). *Escherichia coli* DH5 α (“Thermo Fisher Scientific”, США) использовали для клонирования плазмидных конструкций. Для селекции в среды вносили 20 и 50 мкг/мл канамицина для трансформированных плазмидами штаммов *E. coli* и *M. neoaurum*, соответственно.

Создание рекомбинантных штаммов. Химически синтезированная ДНК-последовательность генов, кодирующих грибную 17 β -ГСД из *C. lunatus* и бактериальную Г6ФД второго типа из *M. tuberculosis* H37Rv (Strizhov et al., 2016), была клонирована в составе одного оперона по сайтам рестрикции *NdeI* и *HindIII* в экспрессионном векторе pMV261N (Fufaeva et al., 2023) под контролем конститутивного промотора *Phsp60* из *Mycobacterium bovis*. Полученная рекомбинантная плазида pMVN25 и вектор pMV261N были перенесены электропорацией в клетки микобактерий, как описано в работе Loraine, Smith (2017), с использованием прибора MicroPulser (“Bio-Rad”, США).

Культивирование штаммов, проведение и анализ продуктов трансформации фитостерина. Выращивание инокулята, проведение трансформации фитостерина целыми клетками (с ежедневным добавлением 5 г/л глюкозы), приготовление среды для процесса (вариант В с заменой пальмитат-стеарата натрия на Tween-80), а также методы анализа стероидов приведены в работе Tekucheva et al. (2022).

Математическая обработка данных. Молярный выход продуктов трансформации (% (мол.)) оценивали как процентное отношение молярных

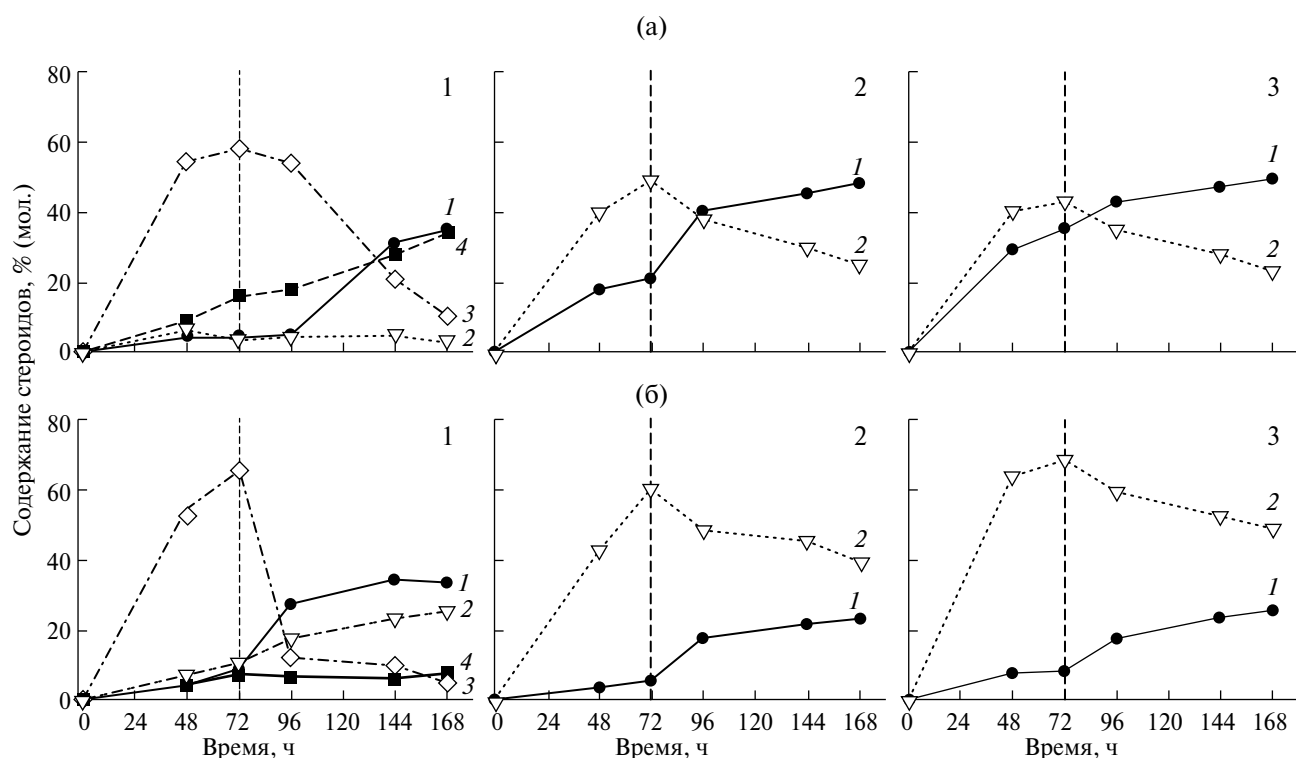


Рис. 1. Трансформация 5 г/л фитостерина родительскими штаммами *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D (16), ВКМ Ас-1815D (26), NRRL В-3805 $\Delta kstD$ (36) и рекомбинантными штаммами, несущими бицистронную генетическую конструкцию под регуляцией конститутивного промотора, созданными на их основе (1а, 2а, 3а, соответственно). Вертикальной пунктирной чертой обозначен момент перехода из окислительного в восстановительный режим. 1 — Т; 2 — АД; 3 — АДД; 4 — дТ.

концентраций продукта к субстрату. Эксперименты повторялись 2–4 раза. Стандартное отклонение составляло не более 4–9% и не приведено на рисунке 1, в таблице 1 и приложении для более ясного представления данных.

В качестве платформ для создания рекомбинантных продуцентов были использованы штаммы *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D, ВКМ Ас-1815D, NRRL В-3805 $\Delta kstD$. Сконструированная плазмида pMVN25 (доп. материалы, рис. S1) позволила осуществить в клетках микобактерий совместную конститутивную экспрессию синтетических генов, кодирующих 17 β -ГСД и Г6ФД. Созданные рекомбинанты *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D (pMV261N) (сокращенно 1816 N25), ВКМ Ас-1815D (pMV261N) (1815 N25), NRRL В-3805 $\Delta kstD$ (pMV261N) (В-3805D N25) не отличались от родительских штаммов по культурально-морфологическим свойствам при росте на плотной среде, а также по скорости роста в жидкой среде (доп. материалы, рис. S2).

Трансформация фитостерина длилась 120 ч и проходила в два этапа: 1) в окислительном этапе (интенсивная аэрация, 0–72 ч) происходило преимущественное накопление С-17-оксостероидов (АД и/или АДД), 2) в восстановительном этапе (сниженная аэрация, 72–120 ч) накапливались С-17-гидроксистероиды (Т и/или дТ).

Доминантным продуктом на окислительном этапе для штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D и 1816 N25 был АДД, его концентрация достигала 65.2 и 58.4% (мол.), соответственно. Более низкое накопление АДД при использовании рекомбинанта 1816 N25 связано с восстановлением АДД до дТ (рис. 1а); в отличие от родительского штамма, 17-ГСД активность в штамме 1816 N25 проявлялась в окислительном режиме при активной аэрации (рис. 1а, 1б).

В восстановительном этапе наблюдалось активное накопление Т как у родительского (Ас-1816D), так и у рекомбинантного (1816 N25) штаммов. Однако у рекомбинанта 1816 N25 образующиеся Т и дТ являются доминантными продуктами, формирование которых возможно по двум путям: 1) АДД $\rightarrow$ дТ $\rightarrow$ Т; 2) АДД $\rightarrow$ АД $\rightarrow$ Т. Изучение последовательности ферментативных реакций, осуществляемых 17 β -ГСД и КстД, приводящих к превалированию пути (1) или (2) в рекомбинантном штамме 1816 N25, является предметом дальнейших исследований. У родительского штамма Ас-1816D биоконверсия идет по пути (2), о чем свидетельствует параллельное накопление АД и Т при снижении содержания АДД в среде. У некоторых штаммов микобактерий двойное восстановление АДД (АДД $\rightarrow$ АД $\rightarrow$ Т) было более эффективным для

Таблица 1. Выход С-17 гидроксистероидов в процессе трансформации 5 и 20 г/л фитостерина родительскими и рекомбинантными штаммами микелицибактерий (н/о — не обнаружено (ниже порога чувствительности метода); н/п — неприменимо)

№ п/п	Штамм	Нагрузка фито- стерина, г/л	Выход Т, % (мол.)	Выход дТ, % (мол.)	Суммарный выход С-17 гидроксистероидов, % (мол.)	Титр Т, г/л
1	Ac-1816D	5	31.9	7.2	39.1	1.1
2	1816 N25		34.8	33.1	67.9	1.2
3	Ac-1816D	20	10.9	3.7	14.6	1.5
4	1816 N25		26.8	9.2	36.0	3.7
5	Ac-1815D	5	22.8	н/о	н/п	0.8
6	1815 N25		47.4	н/о	н/п	1.6
7	Ac-1815D	20	13.8	н/о	н/п	0.5
8	1815 N25		32.2	н/о	н/п	4.4
9	B-3805D	5	20.7	н/о	н/п	0.7
10	B-3805D N25		49.5	н/о	н/п	1.7
11	B-3805D	20	9.5	н/о	н/п	1.4
12	B-3805D N25		27.1	н/о	н/п	4.1

синтеза Т, чем одиночное восстановление 17-оксо-группы АД (АД → Т) (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2009).

Для штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ac-1815D и NRRL B-3805 Δ kstD основным промежуточным продуктом окисления фитостерина являлся АД (рис. 16, 26). Как и для штамма Ac-1816D, у родительских штаммов Ac-1815D и B-3805 Δ kstD выход основного интермедиата в конце окислительного этапа оказался повышенным по сравнению с рекомбинантами. Также в окислительной фазе наблюдали существенное накопление Т — продукта восстановления АД, что свидетельствует о повышенной 17-оксостероид-редуктазной активности у рекомбинантных штаммов (рис. 2а, 3а). Достигнутый с помощью рекомбинантных штаммов 1815 N25 и B-3805D N25 выход и титр Т составил 47.7 и 49.5% (мол.) и 1.6–1.7 г/л, соответственно, (табл. 1).

Фитостерин (5 г/л) утилизировался практически полностью (94.5–99.3%) к началу восстановительной стадии биоконверсии. При увеличении начальной концентрации фитостерина до 20 г/л эффективность его трансформации в Т понизилась у всех изучаемых штаммов. Это связано со снижением эффективности утилизации до 75–82%, и, как следствие, с меньшим накоплением АД/АДД на конец окислительного этапа. Полученные при биоконверсии 20 г/л фитостерина титры Т, составившие 3.7, 4.1 и 4.4 г/л (табл. 1, пп. 4, 8, 12), тем не менее значительно превышают значения, полученные при биоконверсии 5 г/л фитостерина.

Выбор в качестве организма-хозяина штаммов вида *M. neoaurum* обусловлен, с одной стороны, изученностью их путей и ферментов стероидного катаболизма (Donova, 2023), с другой стороны, показанной ранее возможностью одностадийного

получения Т из фитостерина (Tekucheva et al., 2022).

Для смещения реакции в сторону 17-оксостероид-редуктазной активности, осуществляемой эукариотической НАД(Ф)Н-зависимой 17 β -ГСД, с образованием дТ и Т из АДД и АД, соответственно, необходимо достаточное количество восстановленных коферментов НАД(Ф)Н (Tekucheva et al., 2022). Поэтому целевыми генами бицистронной конструкции были: ген грибной 17b-ГСД из *C. lunatus* и ген бактериальной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) из *M. tuberculosis* H37Rv (Karpov et al., 2019).

Самый высокий выход С-17 гидроксистероидов: Т и дТ был показан для всех полученных рекомбинантных штаммов по сравнению с родительскими. Судя по выходу Т, у рекомбинантов 17-оксостероид-редуктазная активность увеличилась в 2–3 раза по сравнению с родительскими штаммами. Для штамма 1816 N25 был получен практически равный выход Т и дТ при биоконверсии 5 г/л фитостерина; однако при учете суммарной 17-оксостероид-редуктазной активности в отношении АД и АДД преимущество рекомбинанта над родительским штаммом становится очевидным (табл. 1, пп. 1, 2).

К настоящему времени молярный выход получаемого биотехнологическими способами Т не превышает 52% даже при низких нагрузках фитостерина – до 5 г/л (Borrego et al. 2000; Kumar et al. 2001; Lo et al., 2002; Egorova et al. 2009; Fernandez-Cabezón et al. 2017). Таким образом, полученные результаты значительно превосходят известные данные и свидетельствуют о перспективности выбранного подхода.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено по гос. заданию Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 122040500054-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Карпов М.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутов А.А., Казанцев А.В., Стрижов Н.И., Донова М.В. Конструирование и функциональный катализ рекомбинантных штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*, несущих гена бациллярных цитохромов CYP106A1 и CYP106A2 // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 6. С. 34–37.
- Karpov M.V., Nikolaeva V.M., Fokina V.V., Shutov A.A., Kazantsev A.V., Strizhov N.I., Donova M.V. Creation and functional analysis of *Mycolicibacterium smegmatis* recombinant strains carrying the bacillary cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 genes // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 947–957.
- Пошехонцева В.Ю., Стрижов Н.И., Карпов М.В., Николаева В.М., Казанцев А.В., Сазонова О.И., Шутов А.А., Донова М.В. Экспрессия синтетического гена CYP102A1-LG23 и функциональный анализ рекомбинантного цитохрома P450 BM3-LG23 в актинобактериях *Mycolicibacterium smegmatis* // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 1631–1641.
- Poshekhontseva V.Y., Strizhov N.I., Karpov M.V., Nikolaeva V.M., Kazantsev A.V., Sazonova O.I., Shutov A.A., Donova M.V. Expression of synthetic cyp102A1-LG23 gene and functional analysis of recombinant cytochrome P450 BM3-LG23 in the actinobacterium *Mycolicibacterium smegmatis* // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. P. 1347–1355.
- Borrego S., Niubó E., Ancheta O., Espinosa M.E. Study of the microbial aggregation in *Mycobacterium* using image analysis and electron microscopy // Tissue Cell. 2000. V. 32. P. 494–590.
- Bragin E., Shtratnikova V., Dovbnya D., Schelkunov M., Pekov Y., Malakho S., Egorova O., Ivashina T., Sokolov S., Ashapkin V., Donova M. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. Strains // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 138. P. 41–53.
- Daffe M., McNeil M., Brennan P.J. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. // Carbohydr. Res. 1993. V. 249. P. 383–398.
- Donova M.V. Current trends and perspectives in microbial bioconversions of steroids // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. Barreiro C., Barredo J.L.: New York: Humana Press., 2023. V. 2704. P. 3–21.
- Egorova O., Nikolayeva V., Sukhodolskaya G., Donova M. Transformation of C19-steroids and testosterone production by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* sp. // J. Mol. Catal. B. Enzym. 2009. V. 57. P. 198–203.
- Fernandez-Cabezón L., Galan B., García J.L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fufaeva S., Dovbnya D., Ivashina T., Shutov A., Donova M. Reconstruction of steroid 1(2)-dehydrogenation system from *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D in *Mycolicibacterium* hosts // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 2720.
- García J.L., Uhia I., Galan B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria // Microb. Biotechnol. 2012. V. 5. P. 679–699.
- He K., Sun H., Song H. Engineering phytosterol transport system in *Mycobacterium* sp. strain MS136 enhances production of 9-hydroxy-4-androstene-3,17-dione // Biotechnol. Lett. 2018. V. 40. P. 673–678.
- Hung B., Falero A., Llanes N., Pérez C., Ramírez M.A. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 497–500.
- Kumar R., Dahiya J.S., Singh D., Nigam P. Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor // Bioresour. Technol. 2001. V. 78. P. 209–211.
- Lo C.K., Pan C.P., Liu W.H. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. P. 280–283.
- Loraine J.K., Smith M.C.M. Genetic techniques for manipulation of the phytosterol biotransformation strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805 // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. Barredo J.L., Heráiz I. New York, NY: Springer New York, 2017. V. 1645. P. 93–108.
- Shao M., Zhao Y., Liu Y., Yang T., Xu M., Zhang X., Rao Z. Intracellular environment improvement of *Mycobacterium neoaurum* for enhancing androst-1,4-diene-3,17-dione production by manipulating NADH and reactive oxygen species levels // Molecules. 2019. V. 24. P. 3841.
- Strizhov N., Karpov M., Sukhodolskaya G., Nikolayeva V., Fokina V., Shutov A., Donova M. Development of mycobacterial strains producing testosterone // Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Chemical Series. 2016. № 3. P. 57–58.
- Su L., Shen Y., Gao T., Cui L., Luo J., Wang M. Regulation of NAD (H) pool by overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase for AD (D) production in *Mycobacterium neoaurum* // Lect. Notes Electr. Eng. 2018. V. 444. P. 357–364.

- Szentirmai A. Microbial physiology of sidechain degradation of sterols // J. Ind. Microbiol. 1990. V. 6. P. 101–116.
- Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.V., Donova M.V. Bioproduction of testosterone from phytosterol by *Mycolicibacterium neoaurum* strains: “one-pot”, two modes // Bioresour. Bioprocess. 2022. V. 9. P. 116.
- Xiong L.B., Liu H.H., Zhao M., Liu Y.J., Song L., Xu Y.X., Wang F.Q., Wei D.Z. Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of kasB in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum* // Microb. Cell Factories. 2020. V. 19. P. 1–11.
- Zhou X., Zhang Y., Shen Y., Zhang X., Zan Z., Xia M., Luo J., Wang M. Efficient repeated batch production of androstenedione using untreated cane molasses by *Mycobacterium neoaurum* driven by ATP futile cycle // Bioresour. Technol. 2020. V. 309. P. 123307.

SHORT COMMUNICATIONS

Single-Stage Bioconversion of Phytosterol into Testosterone by Recombinant Strains of *Mycolicibacterium neoaurum*

D. N. Tekucheva^{1, *}, M. V. Karpov¹, V. V. Fokina¹, T. I. Timakova¹, A. A. Shutov¹,
and M. V. Donova¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 28, 2023

Abstract—A plasmid containing the genes of a fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, which catalyzes the reduction of the steroid core at the C17 position, and mycobacterial glucose-6-phosphate dehydrogenase, which promotes the recycling of the essential coenzyme NAD(P)H, was constructed. Its constitutive expression in well-studied *Mycolicibacterium neoaurum* strains made it possible to increase significantly the yield of C-17 hydroxysteroids. In particular, recombinant strains created on the basis of *M. neoaurum* VKM Ac-1815D and *M. neoaurum* NRRL B-3805 $\Delta kstD$ exhibited predominant accumulation of testosterone, while the strain based on *M. neoaurum* VKM Ac-1816D accumulated dehydrotestosterone and testosterone simultaneously.

Keywords: transformation of steroids, testosterone, phytosterol, *Mycolicibacterium*, heterologous expression, whole-cell catalysis

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ОДНОСТАДИЙНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ФИТОСТЕРИНА
В ТЕСТОСТРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ
MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM

© 2024 Д. Н. Текучева^а, *, М. В. Карпов^а, В. В. Фокина^а, Т. И. Тимакова^а,
А. А. Шутов^а, М. В. Донова^а.

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
ФИЦ “Пущинский научный центр биологических исследований РАН”, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

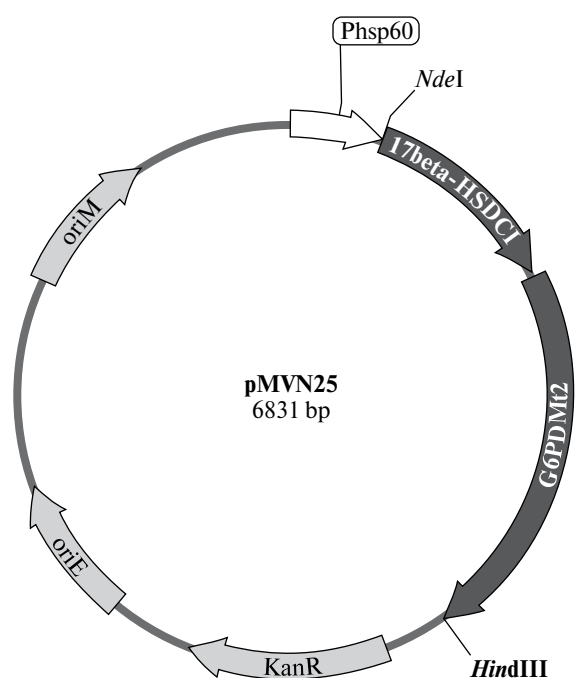


Рис. S1. Структура рекомбинантной плазмиды pMVN25. Синтетические гены, кодирующие 17 β -ГСД из *Cochliobolus lunatus* (17 β -HSDC1) и бактериальную Г6ФДГ 2 типа из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (G6PDMt2), были клонированы в векторе pMV261N под контролем конститутивного промотора Phsp60. Плазмида содержит кассету устойчивости к канамицину (KanR) и точки начала репликации в клетках *E. coli* (oriE) и микобактериях (oriM).

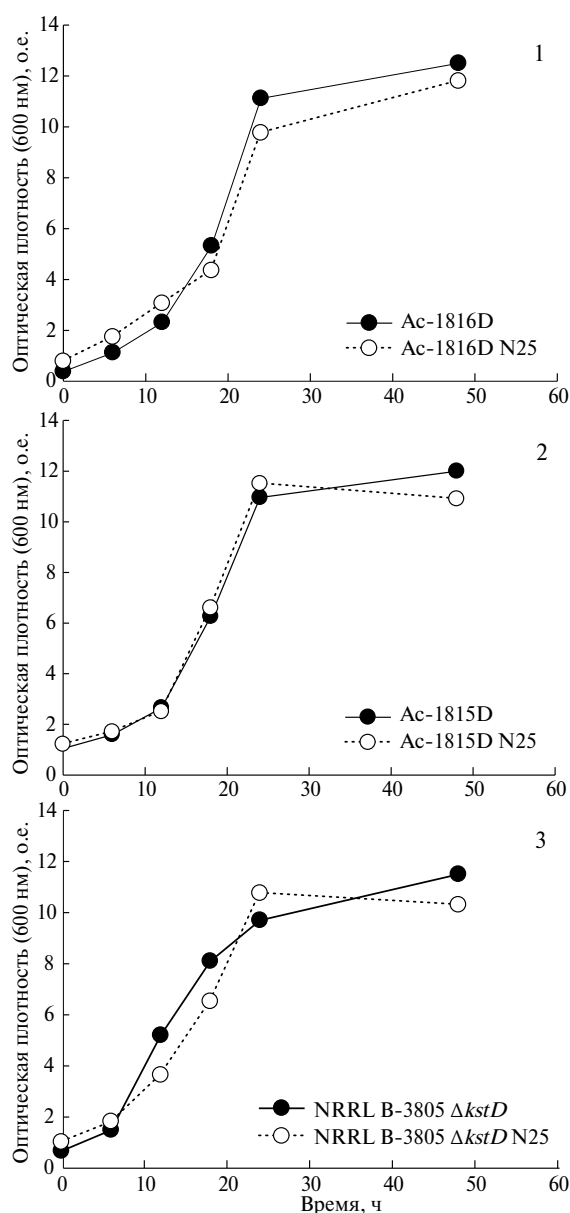


Рис. S2. Динамика роста родительских штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ac-1815D (1), Ac-1816D (2), NRRL B-3805 $\Delta kstD$ (3) и рекомбинантных штаммов, созданных на их основе путем трансформации плазмидой pMVN25 (N25)