

Мальцева Полина Юрьевна

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ МОНОТЕРПЕНОИДА
(–)-ИЗОПУЛЕГОЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета и лаборатории алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь.

Научный руководитель:

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет».

Официальные оппоненты:

Несчисляев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Турковская Ольга Викторовна, доктор биологических наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50).

Защита состоится «17» декабря 2026 г. в 10-00 на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д.13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<https://permisc.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. В настоящее время одним из активно развивающихся направлений в области фармакологии является синтез соединений, обладающих выраженной биологической активностью, на основе растительных терпеноидов. Так, лекарственные средства, полученные на основе вторичных растительных метаболитов, составляют около четверти всего мирового рынка фармацевтических препаратов (Calixto, 2019).

Одним из широко используемых в синтезе биоактивных веществ терпеноидов является монотерпеновый спирт (–)-изопулегол. Низкая себестоимость, доступность и разнообразные биологические свойства (–)-изопулегола обуславливают повышенный интерес исследователей к данному соединению (Minh Le, Szakonyi, 2022). Трансформация (–)-изопулегола с использованием химических методов уже позволила получить соединения с выраженной противовирусной (Nazimova *et al.*, 2017; Пыина *et al.*, 2018), обезболивающей (Li-Zhulanov *et al.*, 2020) и антипролиферативной активностью (Le *et al.*, 2018). Однако химическая модификация обычно протекает при повышенных значениях температуры и pH, часто с использованием дорогостоящих реагентов и необходимостью введения защитных групп реакционно-активных центров молекулы. По сравнению с традиционным органическим синтезом, применение ферментов и целых клеток микроорганизмов для получения энантиомерных чистых соединений технологически более перспективно. Это обусловлено их исключительной хемо- и стереоселективностью, широким кругом метаболизируемых субстратов, и, что немаловажно, устойчивой активностью в экстремальных условиях внешней среды. Такие процессы не требуют проведения многочисленных стадий включения/снятия защитных групп и минимизации побочных реакций. Стоит отметить, что на данный момент исследований, посвященных микробной трансформации (–)-изопулегола, крайне мало. Не так давно группой ученых из США и Греции были предприняты попытки трансформации (–)-изопулегола иммобилизованными ферментами мицелиальных грибов (Su *et al.*, 2020). Ранее Shukla с соавт. (1987) продемонстрировали способность представителей *Rhodococcus* sp. использовать (–)-изопулегол в качестве единственного источника углерода, однако продуктов трансформации детектировано не было (Shukla *et al.*, 1987). Таким образом, актуален поиск новых катализаторов и инновационных технологий, основанных на использовании микроорганизмов, а также новых производных (–)-изопулегола с выраженной биологической активностью.

Одной из широко разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов являются бактерии рода *Rhodococcus*, характеризующиеся большим разнообразием трансформируемых труднодоступных соединений (Anteneh, Franco, 2019; Busch *et al.*, 2019; Krivoruchko *et al.*, 2019). Не мицелиальный характер роста, способность к выработке биосурфактантов, политрофность и лабильность метаболических систем родококков обуславливают целесообразность поиска активных трансформаторов (–)-изопулегола среди представителей данной группы микроорганизмов. Ранее была показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к биотрансформации растительных трициклических дитерпеноидов и пентациклических тритерпеноидов с образованием биоактивных производных (Grishko *et al.*, 2013; Cheremnykh *et al.*, 2018; Luchnikova *et al.*, 2022).

Цель настоящей работы – выявление способности коллекционных штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus* к биотрансформации монотерпеноида изопулегола для получения биологически активных соединений.

Основные задачи исследования:

1. Оценить способность родококков разных видов к биотрансформации (–)-изопулегола. Отобрать наиболее активные штаммы-биотрансформаторы.
2. Идентифицировать продукты бактериальной трансформации (–)-изопулегола, исследовать их биологическую активность.
3. Оценить адаптивные реакции бактериальных клеток на воздействие (–)-изопулегола.
4. Разработать оптимальные условия процесса биотрансформации (–)-изопулегола, обеспечивающие максимальный выход целевых продуктов.
5. Определить локализацию ферментных систем, участвующих в биотрансформации (–)-изопулегола. Исследовать функциональную характеристику генов, кодирующих ферменты, задействованные в превращениях данного монотерпеноида.

Научная новизна. На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, № 285 во Всемирной федерации коллекций культур, <http://www.iegmc.ru>) впервые показана способность актиномицетов вида *Rhodococcus rhodochrous* к биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола с образованием окисленных производных. Показано, что родококки *R. rhodochrous* трансформируют (–)-изопулегол в два новых ранее не описанных соединения – (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильную кислоту. По данным *in silico* анализа, полученные соединения обладают большей растворимостью в воде и меньшей экотоксичностью по сравнению с исходным соединением. Анализ предполагаемой биологической активности метаболитов показал, что оба соединения могут обладать антиэкземной, противоопухолевой, противовоспалительной активностями и использоваться в качестве потенциальных респираторных аналептиков и агентов профилактики рака мочеполовой системы. На основе полученного в ходе бактериальной трансформации исходного монотерпеноида производного – (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола путем последующей его химической модификации синтезирован (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-7-(гидроксиметил)-4-метилоктагидро-2*H*-хромен-4-ол и экспериментально подтверждена выраженная аналгетическая активность соединения. Всесторонние исследования ответных реакций родококков на присутствие (–)-изопулегола (0,025 об. %) показали, что в данной концентрации монотерпеноид не оказывал выраженного влияния на морфологию и жизненные процессы бактериальных клеток. С использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, закрепленных в матрицу криогеля на основе поливинилового спирта, разработан устойчивый биокатализатор процесса получения биоактивных производных (–)-изопулегола. Полученный иммобилизованный биокатализатор увеличивает общий выход целевых продуктов с 54% (свободные клетки) до 87% (иммобилизованные клетки) за один цикл и сохраняет высокую функциональную и операционную активность для эффективного проведения реакции в течение 13 циклов эксплуатации. Установлено, что ключевые

ферментные комплексы, участвующие в биотрансформации (–)-изопулегола, с большой вероятностью локализованы в цитоплазме бактериальных клеток и принадлежат к семейству CYP450-зависимых оксигеназ. С использованием количественной ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР выявлено индуцированное присутствием (–)-изопулегола повышение экспрессии гена, кодирующего цитохром P450 гидроксилазу, что свидетельствует о значимой роли данного фермента в биотрансформации монотерпеноида.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения расширяют представление о биокаталитическом потенциале родококков и возможности их использования в качестве перспективных продуцентов новых фармакологически ценных соединений на основе растительных монотерпеноидов. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий образование ранее не идентифицированных производных (–)-изопулегола – (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильной кислоты. Рентгеноструктурные данные метаболитов размещены в Кембриджском центре кристаллографических данных (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>) под номерами CCDC 2168968 и 2168969, соответственно. Экспериментально установлено участие цитоплазматических ферментных комплексов семейства CYP450 в процессе биотрансформации (–)-изопулегола. Составлен Каталог функциональных генов биотрансформации (–)-изопулегола. Установлена индуцированная экспрессия гена, кодирующего CYP450 гидроксилазу в присутствии (–)-изопулегола. Сведения о полном геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 внесены в международную базу данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_JANFQM000000000.1). Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 по форме «патентное депонирование» передан во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером Ас-2187. Способ биотрансформации (–)-изопулегола для получения биоактивных соединений с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 защищен Патентом на изобретение РФ № 2796679. Разработан эффективный биокатализатор на основе иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, обеспечивающий интенсификацию получения целевых производных (–)-изопулегола. Разработка защищена Патентом РФ 2855467. Результаты исследования используются в учебных курсах «Биоразнообразие и систематика микроорганизмов» и «Введение в биотехнологию» для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штамме-биотрансформаторе (–)-изопулегола внесена в открытую базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegmccl.ru/strains>).

Методология и методы исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием классических микробиологических методов, таких как получение чистых культур микроорганизмов и их культивирование, а также современных микроскопических и аналитических методов. Анализ физиологических и ростовых характеристик штамма-биотрансформатора проводили с использованием высокочувствительной респирометрии, измерения электрокинетического потенциала и каталазной активности. Микроскопические методы включали фазово-контрастную, флуоресцентную, атомно-силовую, конфокальную лазерную сканирующую, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, а также рентгеновскую спектроскопию. Локализацию ферментных систем, участвующих в биотрансформации

(–)-изопулегола, проводили путем выделения отдельных клеточных фракций родококков. Детекцию и идентификацию продуктов трансформации осуществляли методами тонкослойной хроматографии, газовой хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии. *In silico*-анализ производных осуществляли с использованием компьютерной программы ECOSAR и онлайн-сервиса PASS. Биоинформатический анализ генома проводили на основании функциональных аннотаций с помощью сервера Rapid Annotations using Subsystems Technology. Оценку уровней экспрессии предполагаемых функциональных генов проводили методом Пфаффа с использованием количественной ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Из 45 исследованных штаммов бактерий рода *Rhodococcus* 4 штамма (*R. opacus* ИЭГМ 488, *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362) используют изопулегол в качестве единственного источника углерода. Наибольшую (54–100 %) трансформирующую активность проявляет штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий биоконверсию монотерпеноида (до 100%) в концентрации 0,025 об. % в течение 5 сут.

2. С использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 получены ранее не описанные продукты биотрансформации изопулегола: (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильная кислота. По данным *in silico* анализа, метаболиты могут обладать противоопухолевой активностью, а также использоваться в качестве потенциальных стимуляторов дыхания и агентов профилактики онкологических заболеваний. На основе полученного (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола синтезировано соединение с выраженным экспериментально документированным обезболивающим эффектом.

3. Изопулегол в использованной (0,025 об. %) концентрации не оказывает негативного влияния на жизнедеятельность бактериальных клеток.

4. Использование полученного иммобилизованного биокатализатора увеличивает общий выход целевых продуктов биотрансформации изопулегола с 54% (свободные клетки) до 87% (иммобилизованные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362) и сохраняет функциональную и операционную активность в течение 13 циклов эксплуатации.

5. В процессе биотрансформации (–)-изопулегола участвуют цитоплазматические ферментные комплексы, принадлежащие к семейству CYP450. Присутствие монотерпеноида индуцирует повышение уровня экспрессии гена, кодирующего CYP450 гидроксилазу.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Химия. Экология. Урбанистика», Пермь, 2023; VII Международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов (MOSM 2023)», Пермь, 2023; Всероссийской научной школе-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», Владивосток, 2023; 27-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века, Пущино, 2024; IV Международном биотехнологическом форуме «BIOAsia Altai 2024», Барнаул, 2024; IV Школе-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие», Пущино, 2024; 5-ом

Микробиологическом конгрессе, Волгоград, 2025; 14-й Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения», Суздаль, 2026; IV Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» MICRAD 2026, Иркутск, 2026.

По теме диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, в том числе в научных журналах *Molecules*, *Pharmaceuticals*, *Genes*, 1 монография, а также получено 2 Патента Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 49 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 183 наименования работ, в том числе 8 отечественных и 175 зарубежных.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора. Работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ) и «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (Соглашения № 075-15-2021-1051, 075-15-2025-485) и Госзаданий Минобрнауки РФ (FSNF-2025-0013, 124020500028-4), и поддержана грантом Российского научного фонда (№ 24-14-20015). Научные положения и выводы работы базируются на результатах собственных исследований автора. Исследования с использованием системы совмещенного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования проводили на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра ПГНИУ. Исследования с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, а также энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с элементным картированием проводили на базе центра коллективного пользования «Коллекция UNIQEM» (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.) Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН. Идентификацию продуктов трансформации методами газовой хромато-масс спектрометрии и ЯМР-спектроскопии осуществляли на базе лаборатории физиологически активных веществ (рук. – д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Салахутдинов Н.Ф.) Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН. Химический синтез выполнен с.н.с. НИОХ СО РАН, к.х.н. Ильиной И.В. Оценка анальгетической активности выполнена с.н.с. НИОХ СО РАН, д.б.н. Павловой А.В и м.н.с. Филипповой А.Ю.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция бактериальных культур. В работе использовали 45 штаммов актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ; номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, реестровый номер УНУ/ЦКП 73559/480868, www.iegmcol.ru) видов *Rhodococcus erythropolis* (3 штамма), *R. fascians* (2 штамма), *R. jostii* (1 штамм), *R. opacus* (1 штамм), *R. pyridinivorans* (3 штамма), *R. qingshengii* (3 штамма), *R. rhodochrous* (22 штамма) и *R. ruber* (10 штаммов).

Условия культивирования. Биотрансформацию (–)-изопулегола проводили в минерально-солевой среде RS (г/л: K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,02, $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – 0,001), в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере при 160 об/мин и температуре 28°C. В среду дополнительно вносили дрожжевой экстракт (0,1 г/л) и микроэлементы по Постгейту (0,1 об. %). (–)-Изопулегол использовали в концентрации 0,025 об. % (Shukla *et al.*, 1987). В отдельных экспериментах в качестве возможных катализаторов процесса биоконверсии в среду трансформации вносили нанотрубки галлуазита ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$), силикагель, лапонит, MgO, Al_2O_3 . В качестве абиотического контроля использовали неинокулированную среду с (–)-изопулеголом, биотического – инокулированную среду без добавления (–)-изопулегола.

Микроскопические исследования. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия. Визуализацию бактериальных клеток и измерение их размеров осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия), оснащенного фотокамерой AxioCam 506 Color и флуоресцентным источником света HXP 120 V (Zeiss, Германия), в режиме фазового контраста или флуоресценции (FS 106) с увеличением $\times 1000$.

Атомно-силовая (АСМ) и конфокальная лазерная сканирующая (КЛСМ) микроскопия. Использовали систему совмещенного сканирования, состоящую из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США).

Просвечивающая (ПЭМ) и сканирующая (СЭМ) электронная микроскопия. Ультратонкие срезы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), целые клетки – в сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) с картированием элементов. Использовали электронный микроскоп JEM-1400 (Jeol, Япония) с системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания) и программным обеспечением Aztec.

Иммобилизация бактериальных клеток. В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации использовали техническую ткань из нитей СВМ арт. 56313Н ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88 (ООО УкрматериалИнвест, Украина) и полипропиленовые диски PP 5-10SL (Wuhu Ecotech Trade Co, Китай). Процесс иммобилизации проводили при перемешивании 130 об/мин и температуре 28°C в течение 3 сут, незакрепленные клетки отмывали фосфатно-щелочным буфером.

Закрепление актиномицетов в матрицу поливинилового спирта (ПВС) осуществляли согласно методике (Kuyukina *et al.*, 2005). Бактериальную суспензию

(ОП₆₀₀ 1,6; $(8,9 \pm 0,7) \times 10^8$ КОЕ/мл) смешивали со стерильным раствором ПВС (12 %) в соотношении 1:2 об./об. Полученный композит помещали в лунки 96-луночных иммунологических планшетов, замораживали при -15 °С в течение 12 ч, а затем оттаивали при 4 °С в течение 5 ч. Проводили три цикла замораживания-оттаивания. Перед использованием иммобилизованные клетки предварительно регидратировали в 0,5 %-ном растворе хлорида натрия в течение 24 ч. В экспериментах по биотрансформации использовали 40 гранул на 20 мл среды RS. Между циклами биотрансформации гранулы отмывали от среды и промывали фосфатным буфером (рН 7,0).

Локализация ферментных систем. Получение отдельных клеточных фракций осуществляли согласно методике (Tarasova *et al.*, 2017). В работе использовали супернатант с цитоплазматическими ферментами, супернатант с экстрагированными мембранно-связанными ферментами и ресуспендированный соникат с неэкстрагируемыми мембранно-связанными ферментами.

Жизнеспособность бактериальных клеток определяли окрашиванием йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США) и двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits (Invitrogen, США).

Определение электрокинетического потенциала бактериальных клеток проводили с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Для этого клетки предварительно отмывали от среды и ресуспендировали в 10 мМ KNO₃ до ОП₆₀₀ 0,2.

Для детекции внутриклеточных липидных включений бактериальные клетки окрашивали раствором красителя нильский красный (Nanjing Dulai Biotechnology Co., Китай) в ДМСО (Mrunalini and Girisha, 2017).

Респираторная активность. Оценку скорости (мкл/ч) и общее количество потребленного кислорода (мкл) осуществляли с помощью высокочувствительного 10-канального респирометра Columbus Micro-Oxymax (Columbus Instruments, США).

Каталазную активность определяли согласно методике (Gogoleva *et al.*, 2012).

Полногеномное секвенирование проводили на геномном анализаторе MiSeq (Illumina, США) на базе Федерального исследовательского центра Биотехнологии Российской академии наук.

Биоинформатический анализ. Идентификацию структурных генов, генов рибосомных РНК и теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz *et al.*, 2008). Подбор праймеров и сравнение последовательностей целевых генов выполняли с помощью сервисов Primer-BLAST, BLASTN и BLASTP, доступных на сайте NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Поиск кластеров биосинтетических генов в геноме штамма-биотрансформатора осуществляли посредством геномного мининга на онлайн-платформе AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) (Blin *et al.*, 2021).

Молекулярно-генетический анализ. Выделение ДНК и РНК из бактериальных клеток проводили с помощью наборов DNA Blood&Cell и RNASolo (Евроген, Россия), соответственно, предварительно разрушая клетки лизоцимом. Концентрацию и чистоту выделенных нуклеиновых кислот оценивали с помощью флуориметра Qubit[™] (Thermo Fisher Scientific, США) и спектрофотометра NanoPhotometer N50 (Implen, США) соответственно.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для получения кДНК на матрице РНК проводили с использованием набора реактивов с ревертазой Mint (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с готовой смесью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США). Присутствие и размеры продуктов амплификации определяли с использованием системы гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Стабильность референсных генов оценивали в онлайн-сервисе RefFinder, включающий программы geNorm, NormFinder, BestKeeper и метод Delta CT. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом Пфаффа. Нормализацию результатов кПЦР-РВ проводили с использованием отобранных в рамках настоящей работы референсных генов *gyrB* и *secA*. Цифровую ПЦР проводили на амплификаторе RainSure SG-2000 в комплекте со сканером биочипов Dscanner 4-1000 (Suzhou PreciGenome Ltd, Co, Китай).

Качественный и количественный анализ (–)-изопулегола и его метаболитов. Для экстракции остаточного (–)-изопулегола и его метаболитов ферментационную среду подкисляли 10% раствором HCl и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1% водным раствором NaHCO₃ и дистиллированной водой (до pH 7,0). Этилацетатный экстракт обезвоживали над безводным Na₂SO₄. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (Heidolph, Германия).

Качественный контроль проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках ALUGRAM® XtraSILG/UV254 (Macherey-Nagel GmbH&Co, Германия) в системе *n*-гексан – этилацетат (1:1). Визуализацию хроматографических пластинок проводили с использованием йодной камеры или путем обработки пластинки 15%-ным раствором H₂SO₄, последующим нагреванием при 100°C в течение 2–3 мин и облучением ультрафиолетом с длиной волны 365 нм.

Продукты биотрансформации разделяли с помощью колоночной хроматографии с использованием силикагеля (SiO₂, 60–200 мкм, Macherey-Nagel, Германия) в системе гексан:этилацетат с градиентом 100:0–0:100 в качестве элюента.

Газовую хромато-масс спектрометрию (ГХ-МС) проводили с помощью хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США) с квадрупольным спектрометром Agilent 5975C в качестве детектора. Использовали кварцевую колонку HP-5MS (30000×0,25 мм) и He (1 атм) в качестве газа-носителя.

Масс-спектрометрию высокого разрешения проводили на спектрометре DFS (Thermo Scientific, США) в полноэкранном режиме (15–500 *m/z*, 70 эВ электронно-ударная ионизация, прямое введение образца).

Оптическое вращение (α) продуктов биотрансформации определяли с помощью спектрометра polAAR 3005 (Index Instruments Ltd., Великобритания) при длине волны 580 нм для растворов в CHCl₃.

Спектры ¹H, ¹³C и DEPT ЯМР регистрировали с использованием ЯМР-спектрометра Bruker DRX-500 (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при частоте 500,13 МГц (¹H) и 125,76 МГц (¹³C) и ЯМР-спектрометра Bruker Avance-III 600 (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при частоте 600,30 МГц (¹H) и 150,95 МГц (¹³C). В качестве растворителя использовали CDCl₃. Определяли химический сдвиг (δ) в ppm по отношению к остаточному CHCl₃ (δ (H) 7,24, δ (C) 76,90 ppm), *J* в Гц, структурные

разделения с помощью анализа ^1H ЯМР спектров, включающие $^1\text{H} - ^1\text{H}$ спектры двойного резонанса и $^1\text{H} - ^1\text{H}$ 2D гомоядерную корреляцию (COSY, NOESY), J -модулированный ^{13}C ЯМР спектр (JMOD) и $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ 2D гетероядерную корреляцию с одноцепочечными и большерадиусными константами спин-спинового взаимодействия (C – H COSY, $^1J(\text{C},\text{H}) = 135$ Гц; HSQC, $^1J(\text{C},\text{H}) = 145$ Гц; HMBC, $^{2,3}J(\text{C},\text{H}) = 7$ Гц).

In silico анализ (–)-изопулегола и его метаболитов. Экоотоксичность и растворимость (–)-изопулегола и его производных рассчитывали с помощью программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США). Оценку предполагаемой биологической активности полученных производных (–)-изопулегола проводили на основе их структурных формул с использованием онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>).

Химический синтез. К раствору (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола (диола) (1 экв.) и альдегида (1 экв.) в CH_2Cl_2 (5 мл) добавляли монтмориллонит K10 (высушенный при 105°C в течение 3 ч). Масса K10 равна удвоенной сумме масс реагентов. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Затем добавляли 5 мл этилацетата и 5 мл ацетона, катализатор отделяли фильтрацией, полученный фильтрат упаривали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле.

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 %.

Определение антибактериальной активности. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) (–)-изопулегола и продуктов его биотрансформации в отношении бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 определяли методом двукратных серийных разведений (Wiegand *et al.*, 2008) с использованием 96-луночных полистероловых планшетов. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

Анальгетическую активность полученных соединений изучали на стандартных моделях экспериментальной боли «уксусные корчи» (Tolstikova *et al.*, 2012; Khvostov *et al.*, 2016) и «горячая пластина» (Eddy, Leimbach, 1953) в дозе 20 мг/кг на мышах.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трех-, восьми- или десятикратной повторности. Математическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 13 (StatSoft, 2018). Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности коллекционных штаммов актиномицетов к трансформации (–)-изопулегола. По итогам проведенного скрининга коллекционных штаммов актиномицетов лишь отдельные штаммы, относящиеся к видам *R. oracis* (ИЭГМ 488) и *R. rhodochrous* (ИЭГМ 107, ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362) способны использовать (–)-изопулегол в качестве источника углерода и энергии. Для проведения углубленных исследований процесса биотрансформации был отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий наиболее эффективную биоконверсию (Ivshina *et al.*, 2022*). ГХ-МС анализ этилацетатных экстрактов, полученных на 5 сут процесса биотрансформации, позволил выявить наличие двух ранее не описанных производных (–)-изопулегола (1) с m/z 170 (2) и m/z 184 (3) (рис. 1).

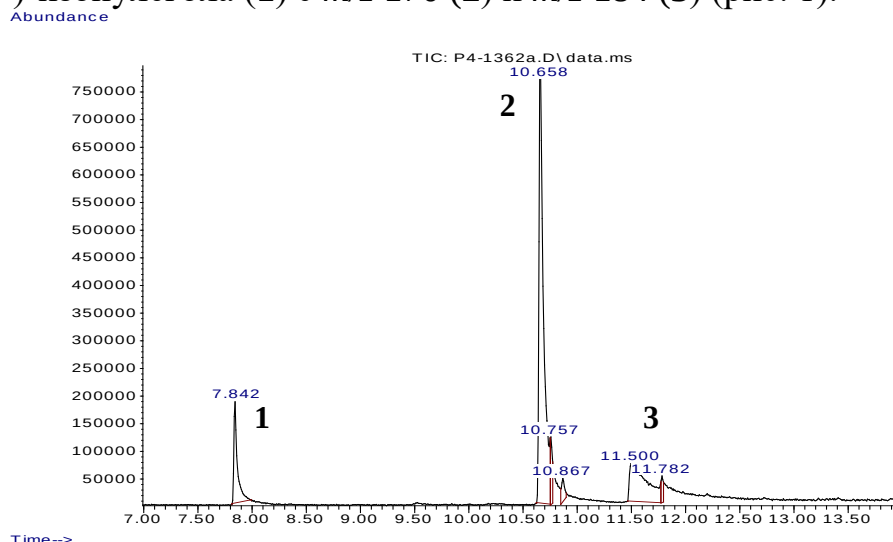


Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта, полученного в процессе трансформации (–)-изопулегола штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Ivshina *et al.*, 2022*)

Результаты исследования динамики трансформации выявили, что максимум дыхательной активности клеток приходился на первые 3 сут независимо от состава среды культивирования (рис. 2) и совпадал с максимумом каталитической активности, проявляемой родококками в отношении терпеноида.

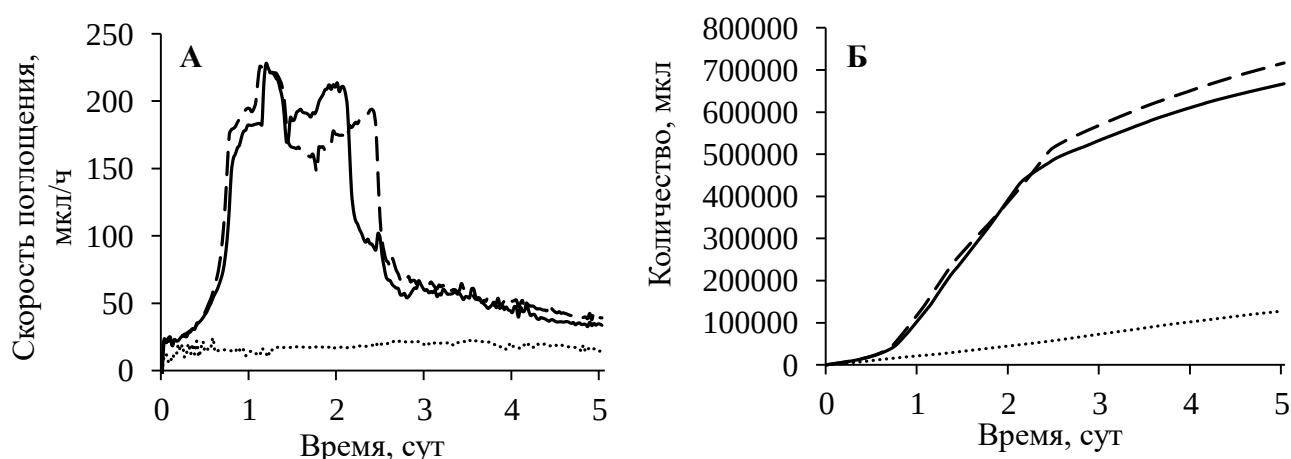


Рисунок 2 – Скорость потребления кислорода (А) и количество потребленного кислорода (Б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола (—). Биотический контроль (---), абиотический контроль (.....) (Ivshina *et al.*, 2022*)

* Здесь и далее – ссылка на публикации по теме диссертации.

Идентификация производных (–)-изопулегола и оценка их биологического потенциала. В результате биотрансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 нами были детектированы два ранее не известных производных: (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол (диол, **2**) и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильная кислота (гидроксикислота, **3**). При этом диол **2**, детектируемый на 2 сутки культивирования родококков, является промежуточным продуктом биотрансформации, который подвергается последующему окислению с образованием гидроксикислоты **3**. Гидроксикислота сохраняется в среде культивирования более 6 месяцев и является конечным продуктом реакции.

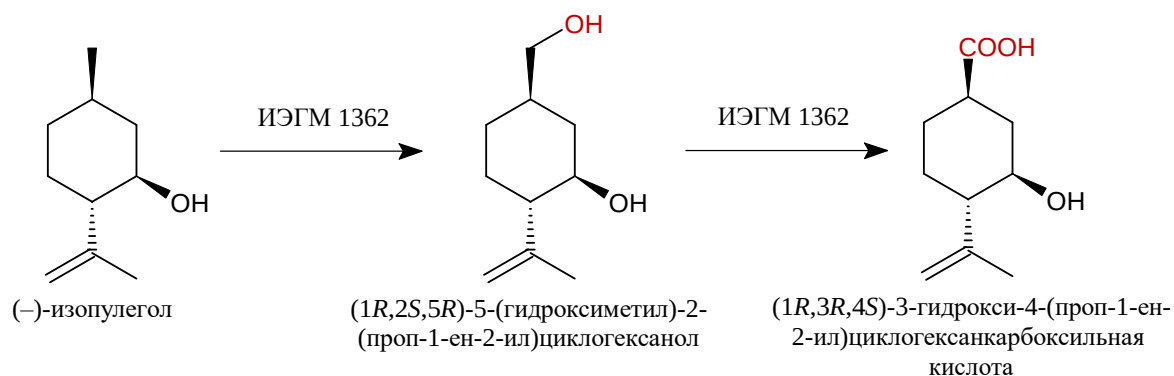


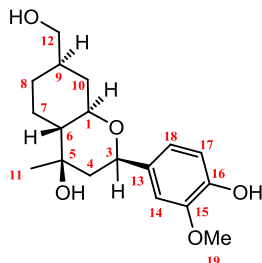
Рисунок 2 – Схема биоконверсии (–)-изопулегола штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Ivshina *et al.*, 2022*)

При разработке новых фармакологических соединений необходимо оценивать их потенциальное негативное воздействие на окружающую среду. Проведенный *in silico* анализ показал, что биоконверсия (–)-изопулегола приводит к образованию менее токсичных и менее гидрофобных продуктов. Острая и хроническая токсичность соединений **2** и **3** снижалась в 6,9–154,1 раза по сравнению с субстратом, при этом их растворимость в воде возрастала в 1,1–20,4 раза. Оценка биопотенциала выявила, что в отличие от (–)-изопулегола, соединения **2** и **3** с высокой вероятностью могут использоваться в качестве респираторных analeптиков, агентов профилактики рака мочеполовой системы и противоопухолевых агентов. Наряду с субстратом, они также могут обладать ветрогонной, противоэкземной, противовоспалительной активностями, выступать в качестве иммуносупрессантов и миорелаксантов, а также индуцировать экспрессию генов иммунного ответа. Полученные метаболиты характеризуются отсутствием фитотоксического эффекта, не обладают выраженной антимикробной активностью в отношении тест-культур. При этом гидроксикислота **3** проявляет наибольший ингибирующий эффект в отношении всех исследованных культур по сравнению с ампициллином.

В связи с высоким прогностическим потенциалом противовоспалительной активности продуктов бактериальной трансформации (–)-изопулегола, нами была проведена их направленная химическая модификация для получения производных с целевой биоактивностью. В результате взаимодействия диола **2** с ванилином был получен (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-7-(гидроксиметил)-4-метилоктагидро-2*H*-хромен-4-ол **4**, проявивший существенную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи» (табл. 1). Полученные данные подтверждают высокую перспективность дизайна новых биологически активных соединений с использованием (–)-изопулегола и продуктов его микробной трансформации в качестве стартовых молекул.

Таблица 1 – Анальгетическая активность производных (–)-изопулегола

Соединение	«Горячая пластинка», τ/сек		«Укусные корчи», N	
	Контроль	Агент (Защита, %) ^a	Контроль	Агент (МВЭ, %) ^b
Диол 2	12,3±1,2	11,3±0,9	8,6±0,8	8,8±1,1
Соединение 4	10,9 ± 2,0	13,3 ± 2,3	11,3 ± 1,5	6,5 ± 1,3* (43%)
Диклофенак натрия	9,6 ± 1,6	15,6 ± 2,4** (62%)	10,1 ± 1,9	5,0 ± 1,1*** (50%)



Примечание. τ – продолжительность нахождения животного на горячей пластине до первой «вокализации». N – количество «корчей». ^a % Защиты = 100% * (K_{опыт} – K_{контроль}) / K_{контроль}, ^b % МВЭ (максимально возможный эффект) = 100% * (K_{контроль} – K_{опыт}) / K_{контроль}, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 по сравнению с контрольной группой.

Влияние (–)-изопулегола на клетки актиномицетов. Анализ АСМ и совмещенных АСМ-КЛСМ изображений позволил выявить скопление капель (–)-изопулегола на поверхности бактериальных клеток (рис. 3). Подобный феномен адгезии субстрата на поверхности клеток ранее был выявлен при актинобактериальной трансформации другого терпеноида – бетулина (Tarasova *et al.*, 2017). Данное явление может объясняться тем, что процесс окислительной конверсии терпеновых субстратов протекает с участием ферментов группы СУР450-зависимых оксигеназ, как правило, ассоциированных с мембраной и требующих непосредственного контакта клетки с субстратом (Schewe *et al.*, 2011).

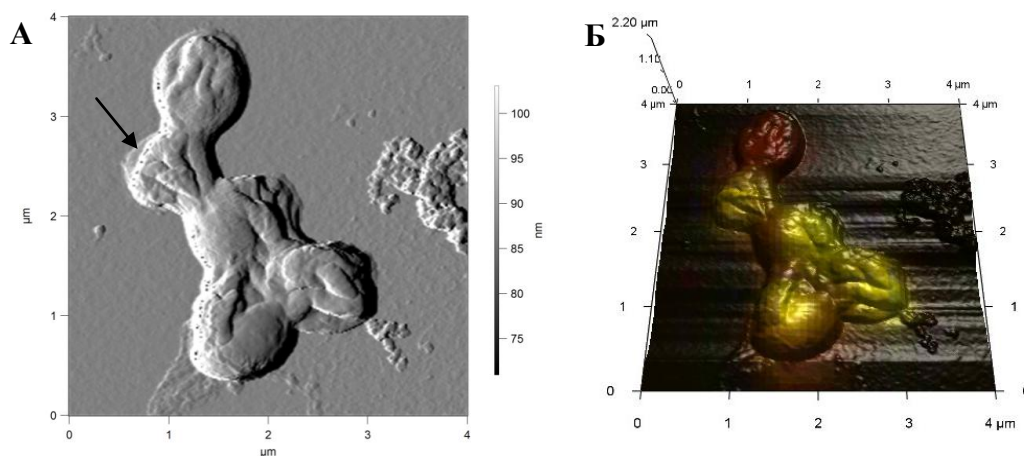


Рисунок 3 – АСМ (А) и совмещённое АСМ-КЛСМ (Б) изображение клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола (Ivshina *et al.*, 2022*). Стрелкой обозначены капли (–)-изопулегола.

Установлено, что внесение (–)-изопулегола в среду культивирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 не оказывало существенного влияния на размеры клеток, относительная площадь клеточной поверхности которых сохранялась в пределах 3,06–3,30 мкм⁻¹, а также дзета-потенциал их клеточной поверхности, что свидетельствует о высокой устойчивости родококков по отношению к монотерпеноиду (табл. 2).

Таблица 2 – Морфометрические параметры клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Варианты опыта	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь (S), мкм ²	Объем (V), мкм ³	S/V, мкм ⁻¹	ζ-потенциал, мВ
Биотический контроль	1,58±0,22	1,12±0,14	4,74±0,69	1,55±0,31	3,06±0,26	-33,3±8,00
(–)-Изопулегол	1,33±0,26	1,15±0,09	4,50±0,33	1,39±0,16	3,24±0,21	-36,8±6,90

Оценка количества биомассы (рис. 4А) и значений кислотности (рис. 4Б) не выявила значимых отличий данных показателей при разном составе среды культивирования. Оптическая плотность культуры как в процессе биотрансформации, так и в контроле постепенно нарастала с ОП₆₃₀ 0,16–0,23 до ОП₆₃₀ 1,15–1,47. При этом жизнеспособность бактериальных клеток сохранялась на уровне 93,62–98,64%. Значения рН среды культивирования колебались в пределах 6,78–7,04 также независимо от внесенных компонентов среды.

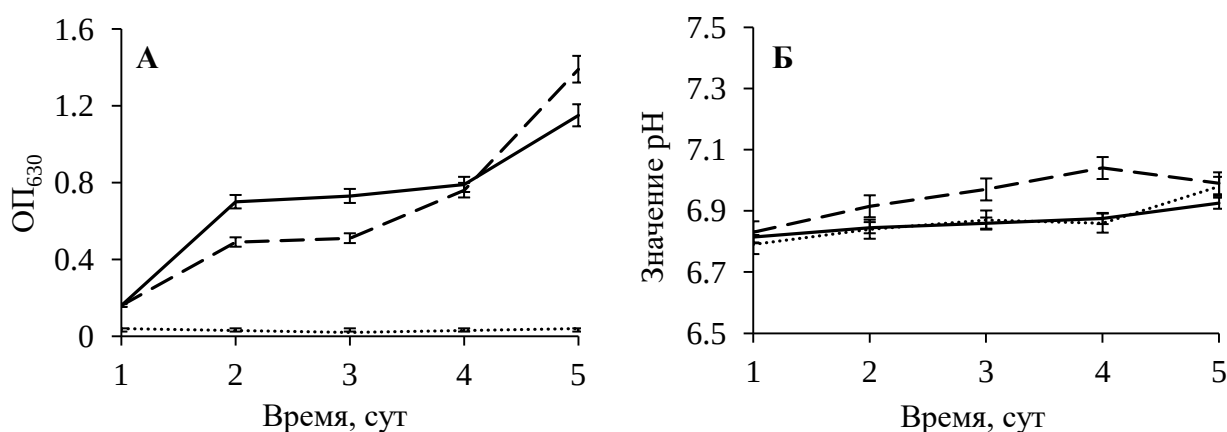


Рисунок 4 – Динамика изменения оптической плотности (А) и рН среды культивирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Б) в присутствии (–)-изопулегола (—). Биотический контроль (---), абиотический контроль (.....) (Ivshina *et al.*, 2022*)

Анализ элементного состава клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 показал, что внесение (–)-изопулегола не сопровождалось заметными изменениями во внутриклеточном пуле и распределении фосфора, калия и кальция (рис. 5). Хорошо определяемое содержание калия свидетельствует о целостности цитоплазматических мембран и активном физиологическом состоянии клеток, что согласуется с ранее полученными данными сравнительного анализа элементного состава растущих, покоящихся и неактивных клеток (Mulyukin *et al.*, 2002).

Сравнительный анализ ультратонких срезов также не выявил значимых отличий в морфологических характеристиках клеток в присутствии (–)-изопулегола. Клетки в обоих вариантах оставались интактными, без признаков лизиса или деформации (рис. 6А). Делящиеся клетки обладали наружным капсульным слоем в виде выростов, многослойной клеточной стенкой различной электронной плотности, характерной для родококков, и интактной цитоплазматической мембраной. Во всех образцах выявлены множественные внутриклеточные липидные включения (рис. 6Б). При этом содержание общих липидов составляло от 8 до 10 %, что характерно для родококков известных видов.

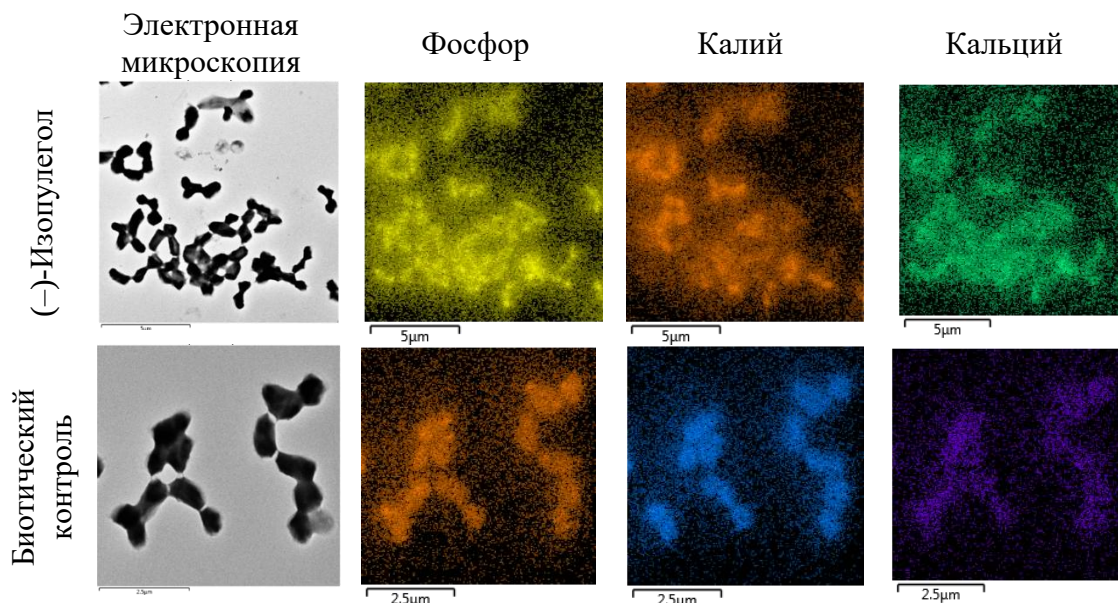


Рисунок 5 – Элементный состав клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, определенный путем картирования с помощью ЭДС (Ivshina *et al.*, 2022*)

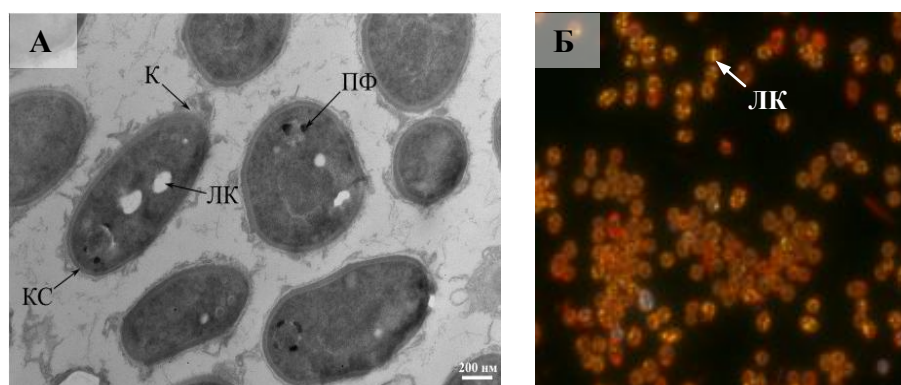


Рисунок 6 – Просвечивающая электронная (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (-)-изопулегола (Ivshina *et al.*, 2022*). К, капсульный слой; КС, клеточная стенка; ПФ, полифосфаты; ЛК, липидные капли.

Оптимизация процесса биотрансформации (-)-изопулегола. С целью увеличения выхода целевых производных (-)-изопулегола нами разработан эффективный биокатализатор на основе иммобилизованных в матрицу криогеля на основе поливинилового спирта (ПВС) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Maltseva *et al.*, 2025*). Использование иммобилизованного биокатализатора увеличивает общий выход целевых продуктов с 54% (свободные клетки) до 87% (иммобилизованные клетки) за один цикл, сохраняя высокую функциональную и операционную активность в течение 13 циклов эксплуатации (рис. 7). По данным ГХ-МС, основными продуктами биотрансформации (-)-изопулегола иммобилизованными клетками являются диол **2**, гидроксикислота **3** и (S)-эпоксид изопулегола с преимущественным образованием гидроксикислоты. Селективность образования гидроксикислоты **3** возрастает от 1 к 5 циклу, затем снижается, достигая минимума в 8 цикле, после чего вновь увеличивается до 72,5–82,4%. Такая динамика может быть связана с явлением вторичного метаболизма: по-видимому, продукты распада мертвых клеток выступают в роли субстратов для выживших клеток, индуцируя вторую волну каталитической активности.

Анализ респираторной активности родококков показал, что с увеличением числа циклов биотрансформации лаг-фаза иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 полностью исчезала, а стационарная фаза становилась более продолжительной. Зафиксированное в это время увеличение общего объема потребляемого кислорода на

30% свидетельствовало о повышении метаболической активности иммобилизованных клеток. Увеличение продолжительности стационарной фазы, в ходе которой отмечается максимальный выход целевых продуктов, может быть связано с усиленной адаптацией клеток и, как следствие, с повышением их устойчивости к стрессу за счет закрепления в матрице ПВС.

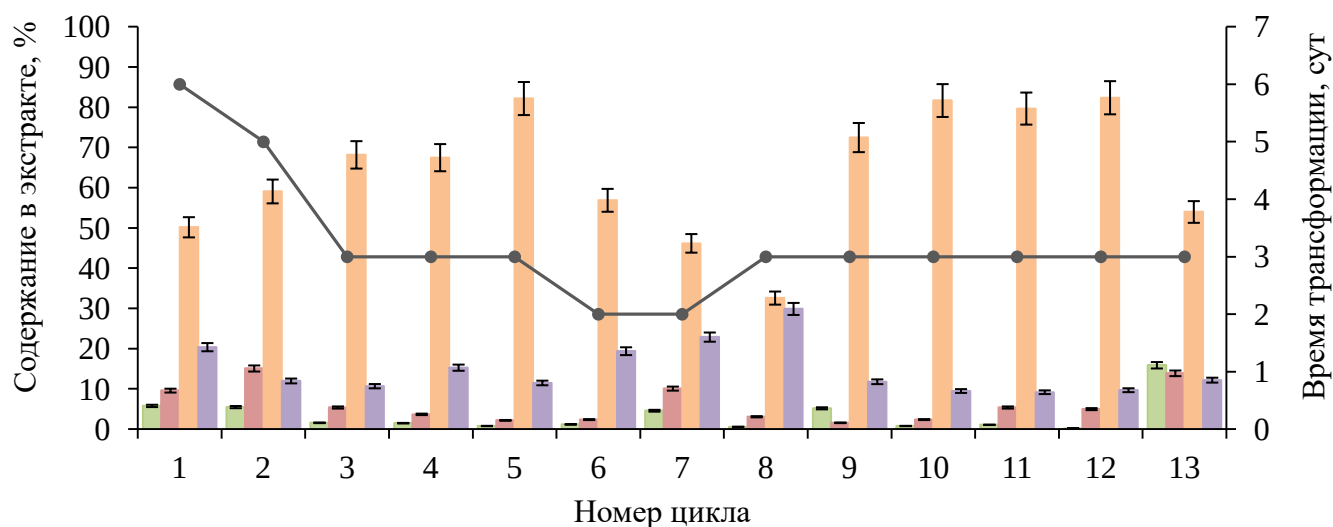


Рисунок 7 – Биотрансформация (–)-изопуглегола иммобилизованными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: ■, (–)-изопуглегол; ■, диол 2; ■, гидроксикислота 3; ■, (S)-эпоксид изопуглегола; —●—, время трансформации, сут (Maltseva *et al.*, 2025*)

Исследование инокулированных гранул ПВС с использованием СЭМ выявило скопления клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в порах криогеля, образующихся в результате процесса замораживания-оттаивания, а также формирование обособленных компактных многоклеточных агрегатов (рис. 8).

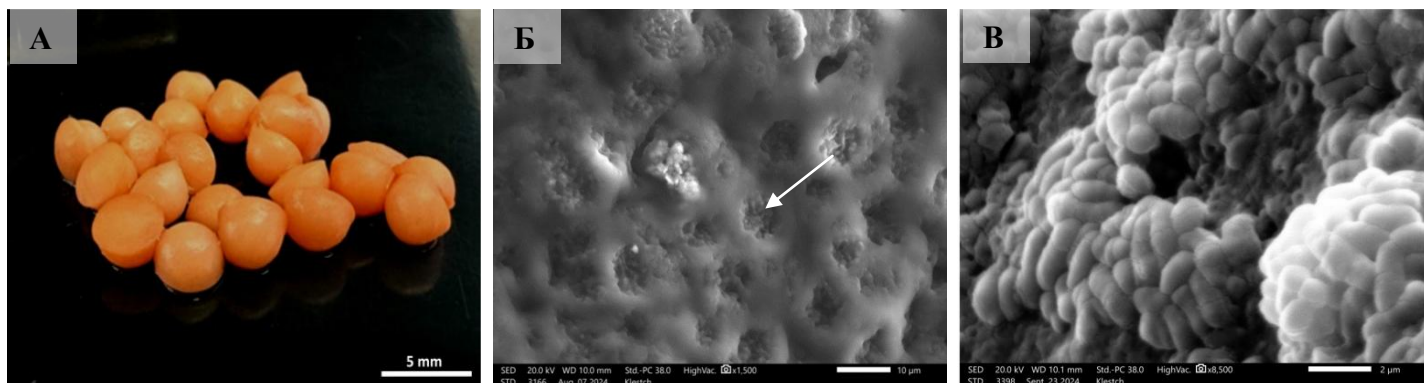


Рисунок 8 – Внешний вид (А) и СЭМ поверхности (Б, В) гранул после 8 циклов с (–)-изопуглеголом. Стрелкой обозначено скопление клеток в макропорах ПВС (Maltseva *et al.*, 2025*)

На ультратонких срезах иммобилизованных клеток не были обнаружены липидные капли и капсульный слой, характерные для свободных клеток. Вероятно, носитель обеспечивает защиту клеток от внешних стрессов, снижая их потребность в накоплении резервных веществ. В то же время структура ПВС способствует аккумуляции субстрата в макропорах, избавляя закрепленные клетки от необходимости адаптивного роста клеточной стенки.

Исследование функциональной характеристики генов, кодирующих ферменты, задействованные в биотрансформации (–)-изопуглегола. По литературным данным, в реакциях микробного окисления монотерпеноидов участвуют цитохром P450-зависимые оксигеназы (Zhang *et al.*, 2020; Maltseva *et al.*,

2024*). Применение в работе ингибиторов активности данных оксигеназ и отдельных клеточных фракций позволило нам подтвердить этот факт в отношении (–)-изопулегола и выявить цитоплазматическую локализацию целевых ферментов.

Биоинформатический анализ результатов проведенного полногеномного секвенирования штамма-биотрансформатора *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 и последующая постановка ПЦР в масштабах реального времени позволили выявить 9 генов, кодирующих ферменты семейства цитохром Р450, в частности монооксигеназы и гидроксилазы (Maltseva *et al.*, 2024*).

В результате постановки количественной ПЦР нами зафиксировано индуцированное повышение экспрессии гена № 6, кодирующего цитохром Р450-зависимую гидроксилазу (Maltseva *et al.*, 2025*). Относительный уровень экспрессии данного гена в присутствии изопулегола оказался в 16 раз выше контрольных значений (рис. 9). В связи с этим мы предполагаем, что именно этот ген обуславливает направленную каталитическую активность бактериальных клеток.

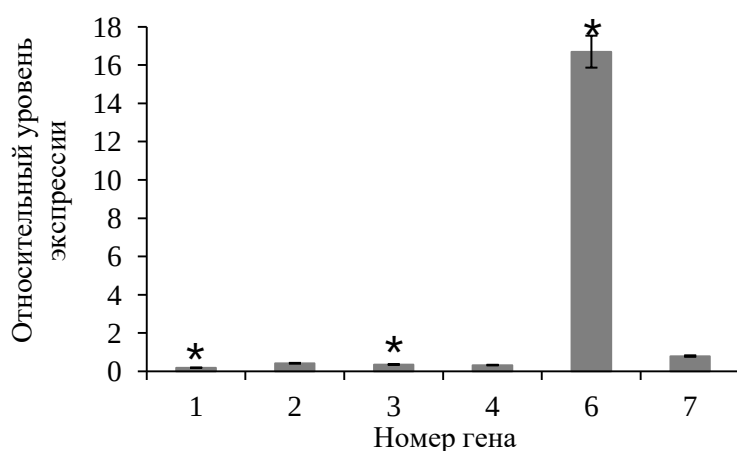


Рисунок 9 – Относительный уровень экспрессии генов СYP450 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола. *Данные являются статистически достоверными (p -value < 0,05) (Maltseva *et al.*, 2025*)

Анализ генетического окружения позволил выявить белки-партнеры цитохромов – ферредоксин и ферредоксинредуктазу – в непосредственной близости СYP450 № 6. Можно предположить, что гены, кодирующие СYP450 № 6, ферредоксин и ферредоксинредуктазу, представляют собой единый генный кластер, экспрессируемый в виде полицистронного транскрипта, и отвечают за отдельный метаболический процесс, вероятно, за превращение (–)-изопулегола.

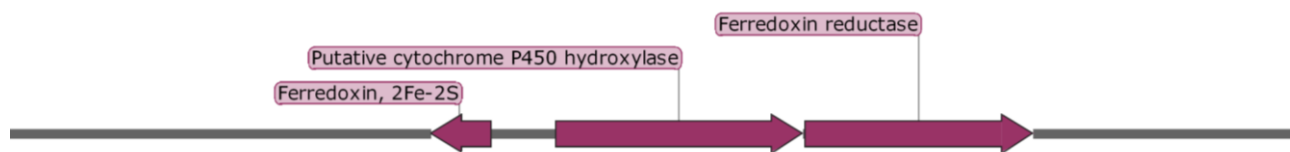


Рисунок 10 – Окружение гена СYP450 № 6 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

С целью более детального изучения генетических механизмов, лежащих в основе трансформации (–)-изопулегола родококками, был проведен молекулярно-генетический анализ ещё одного штамма, характеризующегося высокой каталитической активностью, – *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (Plotnitskaya *et al.*, 2025*). В геноме штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 обнаружено 9 генов, кодирующих ферменты семейства СYP450, нуклеотидные последовательности которых на 100 % идентичны последовательностям генов штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362. Анализ результатов цифровой ПЦР подтвердил значительное повышение уровня экспрессии гена № 6 в клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии (–)-изопулегола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <https://www.iegmc.ru>) впервые показана способность вида *Rhodococcus rhodochrous* к биотрансформации (–)-изопулегола с образованием ранее не идентифицированных соединений – (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильной кислоты. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 с наибольшей каталитической активностью в отношении данного монотерпеноида. По данным *in silico* анализа, полученные нами новые соединения обладают большей растворимостью в воде и меньшей экотоксичностью по сравнению с исходным соединением. Анализ предполагаемой биологической активности метаболитов показал, что оба соединения могут обладать антиэкземной, противоопухолевой, противовоспалительной активностями и использоваться в качестве респираторных аналептиков и агентов профилактики рака системы пищеварения. На основе (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола синтезирован (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-7-(гидроксиметил)-4-метилоктагидро-2*H*-хромен-4-ол, проявляющий выраженную анальгетическую активность *in vivo*. Разработка может стать основой для создания обезболивающих препаратов нового поколения.

Всесторонние исследования ответных реакций родококков на присутствие (–)-изопулегола (0,025 об. %) показали, что в данной концентрации монотерпеноид не оказывал выраженного влияния на морфологию и жизненные процессы бактериальных клеток. Полученные данные свидетельствуют об устойчивости бактериальных клеток к используемым концентрациям (–)-изопулегола и возможности проведения будущих исследований с повышенными концентрациями.

Разработан эффективный биокатализатор на основе иммобилизованных в матрицу криогеля на основе поливинилового спирта клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 для получения целевых производных (–)-изопулегола. Использование иммобилизованного биокатализатора увеличивает общий выход целевых продуктов с 54% (свободные клетки) до 87% (иммобилизованные клетки) за один цикл, сохраняя высокую функциональную и операционную активность в течение 13 циклов эксплуатации. С использованием методов электронной микроскопии, элементного картирования и респирометрического анализа охарактеризованы морфологические особенности иммобилизованных бактериальных клеток. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения иммобилизованных в матрицу ПВС клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362 для эффективного получения биоактивных производных монотерпеноида (–)-изопулегола. Перспективным направлением дальнейших исследований является оптимизация данного биокаталитического процесса, а также интеграция иммобилизованных клеточных систем в реакторы непрерывного действия для масштабирования процесса синтеза фармацевтически значимых производных монотерпеноидов.

С использованием отдельных клеточных фракций и ингибиторов активности ферментов семейства CYP450 экспериментально обосновано участие данных ферментных комплексов в процессе бактериальной трансформации монотерпеноидов и их цитоплазматическая локализация. Полногеномное секвенирование штамма-активного биотрансформатора *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 позволило исследовать

генетически обусловленные механизмы биотрансформации (–)-изопулегола. С применением методов биоинформатического анализа создана библиотека функциональных генов CYP450 и изучено их генетическое окружение. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР выявлено индуцированное присутствием (–)-изопулегола повышение экспрессии гена, кодирующего цитохром P450 гидроксилазу, что свидетельствует о значимой роли данного фермента в биотрансформации. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейших исследований молекулярно-генетических основ превращения монотерпеноида, включая транскриптомный анализ, направленный мутагенез функциональных генов и их гетерологическую экспрессию.

Полученные данные расширяют представление о каталитическом потенциале актиномицетов рода *Rhodococcus* и перспективах их использования для создания устойчивых биокатализаторов процесса трансформации растительных терпеноидов для получения фармакологически значимых соединений.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана способность бактерий *Rhodococcus rhodochrous* к биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий образование ранее не идентифицированных карбокси- и гидрокси- производных.

2. Установлено, что продуктами биотрансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 являются (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол и (1R,3R,4S)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильная кислота. По данным *in silico* анализа, оба метаболита характеризуются меньшей гидрофобностью и экотоксичностью по сравнению с исходным соединением, а также обладают противоопухолевой активностью, и применимы в качестве респираторных аналептиков или агентов профилактики рака мочеполовой системы. Экспериментально обосновано, что соединение, полученное на основе (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола, обладает выраженным обезболивающим эффектом.

3. Установлено, что (–)-изопулегол не нарушает процессы жизнедеятельности клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362.

4. Установлено, что ферментные комплексы, участвующие в биотрансформации (–)-изопулегола, с большой степенью вероятности локализованы в цитоплазме бактериальных клеток и принадлежат к семейству CYP450-зависимых оксигеназ. С использованием количественной ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР выявлено повышение экспрессии гена, кодирующего цитохром P450 гидроксилазу, что свидетельствует о ключевой роли данного фермента в биотрансформации

5. Разработан высокоэффективный биокатализатор на основе иммобилизованных в матрицу криогеля поливинилового спирта клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 для получения биоактивных производных (–)-изопулегола. Использование иммобилизованного биокатализатора увеличивает общий выход целевых продуктов с 54% (свободные клетки) до 87% (иммобилизованные клетки) за один цикл, сохраняя высокую функциональную и операционную активность в течение 13 циклов эксплуатации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз

1. Ivshina I.B., Luchnikova N.A., **Maltseva** P.Y., Ilyina I.V., Volcho K.P., Gatilov Y.V., Korchagina D.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Salakhutdinov N.F. Biotransformation of (–)-isopulegol by *Rhodococcus rhodochrous* // Pharmaceuticals. – 2022. – V. 15. – Article 954. DOI: 10.3390/ph15080964. (Scopus, WoS, IF 5,215, Q1).

2. **Maltseva** P.Y., Plotnitskaya N.A., Ivshina I.B. Transformation of terpenoids and steroids using actinomycetes of the genus *Rhodococcus* // Molecules. – 2024. – V. 29. – Article 3378. DOI: 10.3390/molecules29143378. (WoS, Scopus, IF 4,2, Q1).

3. **Maltseva** P.Y., Plotnitskaya N.A., Krivoruchko A.V., Beletskiy A.V., Rakitin A.L., Mardanov A.V., Ivshina I.B. Bioinformatics analysis of the genome of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362, an (–)-isopulegol biotransformer // Genes. – 2024. – V. 15. – Article 992. DOI: 10.3390/genes15080992. (WoS, Scopus, IF 2,8, Q2).

4. **Maltseva** P.Yu., Plotnitskaya N.A., Chudinova A.A., Ilyina I.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Ivshina I.B. *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362 immobilized in macroporous PVA cryogel as an effective biocatalyst for the production of bioactive (–)-isopulegol compounds // Pharmaceuticals. – 2025. – V. 18. – Article 839. DOI: 10.3390/ph18060839. (WoS, Scopus, IF 4,3, Q1).

5. Plotnitskaya N.A., **Maltseva** P.Y., Ivshina I.B. Genome annotation and catalytic profile of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107, mono- and diterpenoid biotransformer // Genes. – 2025. – V. 16. – Article 739. DOI: 10.3390/genes16070739. (WoS, Scopus, IF 3,2, Q2).

6. **Maltseva** P.Y., Plotnitskaya N.A., Ivshina I.B. Molecular-genetic research of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362, an active (–)-isopulegol biotransformer // Molecules. – 2025. – V. 30. – Article. 3976. DOI: 10.3390/molecules30193976. (WoS, Scopus, IF 5,0, Q1).

Монографии

1. Плотницкая Н.А., **Мальцева** П.Ю., Ившина И.Б. Микробная трансформация растительных терпеноидов. – УрО РАН, 2026. – 144 с. ISBN 978-5-7691-2640-6.

Патенты

1. Патент РФ 2796679. Ившина И.Б., Лучникова Н.А., **Мальцева** П.Ю., Ильина И.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Способ биотрансформации растительного монотерпеноида (–)-изопулегола для получения новых биологически активных соединений. Приоритет изобр. от 14.10.2022. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 29.05.2023. Бюл. № 16.

2. Патент РФ 2855467. **Мальцева** П.Ю., Плотницкая Н.А., Чудинова А.А., Ившина И.Б. Способ получения биологически активных производных монотерпеноида (–)-изопулегола с использованием иммобилизованных клеток *Rhodococcus rhodochrous*. Приоритет изобр. от 07.05.2025. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 02.02.2026. Бюл. № 4.

Публикации в других журналах и сборниках

1. **Maltseva** P.Yu., Luchnikova N.A., Ivshina I.B. Salakhutdinov N.F. Obtaining compounds with promising bioactivity from (–)-isopulegol by *Rhodococcus*

rhodochrous IEGM 1362 cells // Материалы Всероссийской научно-практической конференции (с международным участием) «Химия. Экология. Урбанистика», Пермь, 19–21 апреля 2023 г. – Т. 2. – С. 67–70.

2. **Мальцева П.Ю.**, Лучникова Н.А., Ильина И.В., Ившина И.Б., Салахутдинов Н.Ф. Использование актиномицетов рода *Rhodococcus* для получения биологически активных соединений на основе (–)-изопулегола // Сборник тезисов VII Международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов (MOSM 2023)», Пермь, 10–16 сентября 2023 г. – С. 144.

3. **Мальцева П.Ю.**, Лучникова Н.А., Ильина И.В., Ившина И.Б., Салахутдинов Н.Ф. Родококки как эффективные катализаторы биосинтеза фармакологически значимых соединений на основе монотерпеноидов // Тезисы докладов конференции «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», Владивосток, 3–7 октября 2023 г. – С. 113.

4. **Мальцева П.Ю.**, Ильина И.В., Лучникова Н.А. Биотрансформация (–)-изопулегола актиномицетами рода *Rhodococcus* как способ получения новых биологически активных соединений // Сборник тезисов 27-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Пущино, 22–25 апреля 2024 г. – С. 210.

5. **Мальцева П.Ю.**, Плотницкая Н.А., Чудинова А.А., Ильина И.В., Салахутдинов Н.Ф., Ившина И.Б. Биотрансформация растительных монотерпеноидов актиномицетами рода *Rhodococcus* // Материалы IV Международного биотехнологического форума «BIOAsia Altai 2024», Барнаул, 23–28 октября 2024 г. – Т. 4. – № 4. – С. 144–147.

6. **Мальцева П.Ю.**, Плотницкая Н.А., Ившина И.Б. Выявление функциональных генов, участвующих в биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола актиномицетами рода *Rhodococcus* // Сборник тезисов IV Школы-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие», Пущино, 3–5 декабря 2024 г. – С. 40–41.

7. Плотницкая Н.А., **Мальцева П.Ю.**, Ившина И.Б. Получение новых биологически активных соединений на основе бактериальной трансформации монотерпеноида (–)-изопулегола // Сборник тезисов докладов XI Всероссийского форума молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2025», Калининград, 10–18 апреля 2025 г. – С. 88.

8. **Мальцева П.Ю.**, Плотницкая Н.А., Чудинова А.А., Ильина И.В., Салахутдинов Н.Ф., Ившина И.Б. Способ получения биоактивных производных (–)-изопулегола с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362 // 5-й Российский микробиологический конгресс: сборник тезисов докладов, Волгоград, 29 сентября–3 октября 2025 г. – С. 197.

9. **Мальцева П.Ю.**, Плотницкая Н.А., Ившина И.Б. Бактериальная трансформация растительных монотерпеноидов для получения биоактивных соединений // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания», Иркутск, 24–29 августа 2026 г. – С. 214–216.

Мальцева Полина Юрьевна

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ МОНОТЕРПЕНОИДА
(–)-ИЗОПУЛЕГОЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1.
Тираж 120 экз. Заказ
Набор компьютерный.

Отпечатано в «ИЭГМ УрО РАН»
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13

