

УДК 576.631.46

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Г. К. СКРЯБИН, К. А. КОЩЕЕНКО, В. И. СУРОВЦЕВ

**ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРОИДОВ КЛЕТКАМИ И БЕСКЛЕТОЧНЫМ
ПРЕПАРАТОМ КУЛЬТУРЫ MYCOBACTERIUM GLOBIFORME 193,
ВКЛЮЧЕННЫМИ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ**

Установлено, что использование иммобилизованных ферментов дает ряд преимуществ по сравнению с применением обычных растворимых ферментов. Эти преимущества обусловлены возможностью их неоднократного применения и в ряде случаев повышенной устойчивостью к денатурации⁽¹⁾.

В большинстве работ исследовались односубстратные ферменты. Промышленные процессы, в которых применяются иммобилизованные ферменты, также являются односубстратными⁽¹⁻³⁾. Иммобилизованные многосубстратные ферментные системы вследствие необходимости добавления кофакторов и разобщенности ферментов в пространстве могут не дать нужных результатов⁽⁴⁾. Кроме того, зачастую выделение и очистка таких ферментов, как, например, II β -гидроксиплазы стероидных соединений, связаны с большими трудностями. Было показано, что метод иммобилизации ферментов — включение ферментов в гель, поры которого достаточно малы для удерживания фермента, но достаточно велики для доступа субстрата, — применим и для включения клеток микроорганизмов⁽⁵⁻⁸⁾ и может явиться одним из путей для получения иммобилизованной полиферментной системы. Действительно, клетка для своей работы не нуждается в добавлении кофакторов. Ферменты, осуществляющие какой-нибудь цикл превращения, в этом случае пространственно сближены, и, следовательно, эффективность такой системы по сравнению с той же системой в растворе может быть гораздо выше. Преимущество иммобилизованных клеток по сравнению с клетками, ведущими процесс в обычных условиях, заключается в непрерывном удалении продукта из сферы реакции. При разработке способа иммобилизации клеток встает вопрос о влиянии процессов, происходящих при полимеризации, на жизнеспособность культур. Показано, что клетки *Escherichia coli* и *Tetrahymena pyriformis*, включенные в полиакриламидный гель, интактны, так как способны к дыханию и размножению⁽⁷⁾. С помощью электронной микроскопии также показано, что клетки *Str. faecalis* остаются жизнеспособными через 11 суток после включения их в гель⁽⁸⁾.

Целью настоящей работы является разработка способа включения клеток в гель и изучение влияния включения клеток *M. globiforme* в гель на их жизнеспособность и энзиматическую активность, а также исследование 1,2-дегидрогеназной активности иммобилизованного бесклеточного экстракта этой же культуры.

Мы включали в полиакриламидный гель клетки культуры *M. globiforme* 193, которая проводит 1,2-дегидрирование Δ^4 -3-кетостероидов⁽⁹⁾ и как сопутствующие реакции 1,2-гидрирование⁽¹⁰⁾, восстановление 20-кетогруппы до 20 β -оксигруппы и деацетилирование⁽¹¹⁾. Полимеризацию исходного мономера акриламида проводили в присутствии клеток культуры поперечносшивающего реагента — N,N-метилена-бисакриламида с последующим добавлением в систему персульфата аммония и N,N,N,N-тетраметилэтилендиамина. Полимеризацию проводили в атмосфере азота при температуре 10–12°. Применяли 10% гель с 6% относительным со-

держанием сшивающего агента. Процесс проходил примерно за 15 мин. Полученный блок геля разрезали, продавливали через сито 20–30 меш и промывали большим количеством воды до отсутствия клеток в промывных водах. Гранулы геля помещали в колонку (1×26 см), через которую при температуре 28° пропускали со скоростью 5 мл/час растворы субстратов. Эта же методика была применена для включения в гель бесклеточного экстракта *M. globiforme*, полученного после разрушения клеток ультразвуком. Гранулы помещали в колонку 1×78 см. Для определения продуктов трансформации использовали метод количественной тонкослойной хроматографии. Метод включения клеток в гель дал стабильные гранулы, заполненные клетками. Предварительно мы исследовали жизнеспособность иммобилизованных клеток, их способность к размножению и интенсивность дыхания.

Способность к размножению определена по методу, предложенному Апдайком (7). Проводили включение в гранулы обычной клеточной суспензии и суспензии, убитой нагреванием (контроль) по вышеописанной методике. Гранулы хранили в холодильнике. Через 2 суток часть гранул промывали стерильной водопроводной водой, затем растирали в ступке. Полученную суспензию разводили стерильной водопроводной водой и высевали на МПА. Культура дала обильный рост (20–30 колоний на чашке Петри). В контроле были единичные колонии (2–3) посторонней микрофлоры.

Часть гранул с включенными клетками использовали для определения интенсивности дыхания в аппарате Варбурга. В качестве субстрата для дыхания применяли глюкозу. Контролем служили гранулы с клетками, убитыми нагреванием. Оказалось, что интенсивность дыхания для клеток, включенных в гель, равна 84 мкл O_2 в 1 час на 40 мг сухого геля или на 2 мл суспензии гранул. Полученные данные позволяют сделать вывод о жизнеспособности иммобилизованной культуры. При проведении процесса трансформации с помощью гранул с клетками *M. globiforme* были получены результаты, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Трансформация стероидов клетками *Mycobacterium globiforme*, включенными в гель

Субстрат	Исходная концентрация стероида, мг/мл	Выход 20 β -оксипроизводного, %	
		через 3 часа	через 20 час.
Гидрокортизон	0,2	100	100
Кортизон	0,2	100	100
Вещество Рейхштейна *	0,2	75	50
Преднизолон	0,2	100	—
Преднизон	0,1	100	100
Δ -1,2-производное вещества «S» Рейхштейна	0,05	75	40

* Использовали суспензию субстрата.

Из данных табл. 1 следует, что культура, включенная в гель, проводит селективное 20 β -восстановление. В случае вещества «S» и его 1,2-производного восстановление сопровождается деструкцией стероида, что приводит к снижению выхода 20 β -оксипроизводных. Образования каких-либо других Δ^4 -3-кетостероидов не отмечено. В обычных условиях культура осуществляет восстановление 20-кетогруппы стероидов наряду с 1,2-дегидрированием или 1,2-гидрированием кольца А стероидной молекулы.

По-видимому, это обусловлено специфическими условиями, вызванными включением клеток в гель. Следует отметить, что получение 20 β -оксипроизводных — процесс, происходящий при участии НАД-Н₂, — указывает либо на интактность клеток, либо по крайней мере на сохранение значительной части структуры клеток, потому что в противном случае низкомолекулярный кофактор удалялся бы при отмывке геля. Известно, что бесклеточный препарат *M. globiforme* проводит процесс 1,2-дегидрирования Δ^4 -3-кетостероидов без добавления кофакторов (⁹). В опытах, проведенных нами, иммобилизованный экстракт без добавления кофакторов не проводит 1,2-дегидрирования гидрокортизона. Вероятно, низкомолекулярный кофактор удаляется при промывании полученных гранул от белка, не включившегося в гель. В присутствии искусственного акцептора водорода, феназинметасульфата (концентрация субстрата и акцептора 0,2 мг/мл), при скорости потока через колонку 5 мл/час 1,2-дегидрирование проходило на 25–30 %.

Таким образом, нами показано, что клетки культуры *M. globiforme* 193, включенные в полиакриламидный гель, способны осуществлять селективное 20 β -восстановление ряда кортикостероидов. Клетки культуры остаются интактными после включения их в гель. Бесклеточный экстракт этой культуры, включенный в гель, проводит 1,2-дегидрирование в присутствии кофактора — феназинметасульфата. В настоящее время нами проводятся исследования по использованию клеток, включенных в полиакриламидный гель, для осуществления процессов 11 β -гидроксилирования и 1,2-дегидрирования.

Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
28 XI 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Katchalski, Proc. IV Intern. Ferment Symp., 1972, p. 353. ² E. J. Beckhorn, Biotechnol. Bioeng. Symp., № 3, 355 (1972). ³ T. Chibata, T. Tosa et al., Proc. IV Intern. Ferment. Symp., 1972, p. 383. ⁴ H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, J. Chromatogr., v. 35, 103 (1968). ⁵ K. Mosbach, R. Mosbach, Acta chem. scand., b. 20, 2807 (1966). ⁶ K. Mosbach, P. O. Larsson, Biotechnol. Bioeng., v. 12, 19 (1970). ⁷ S. J. Updike, D. R. Harris, E. Shrago, Nature, v. 224, 1122 (1969). ⁸ N. E. Franks, Biotechnol. Bioeng. Symp., № 3, 327 (1972). ⁹ Г. Р. Скрябин, И. С. Звягинцева, Л. В. Соколова, Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 75 (1970). ¹⁰ М. И. Бухар, Кандидатская диссертация, Инст. микробиол. АН СССР, 1970. ¹¹ К. А. Коцеевко, Е. А. Борман и др., Микробиол. пром., т. 46, 33 (1972).