

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР УРАЛЬСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Мальцева Полина Юрьевна

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор, академик РАН
Ившина Ирина Борисовна

Пермь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Обзор литературы.....	13
Глава 1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ МОНОТЕРПЕНОИДОВ.....	13
1.1. Химические свойства и распространение в природе	13
1.2. Биологическая активность монотерпеноидов и их производных.....	20
1.3. Биологическая трансформация монотерпеноидов с использованием бактерий	25
1.3.1. Использование биохимического потенциала целых бактериальных клеток.....	25
1.3.2. Использование бактериальных ферментов	31
1.4. Биологическая трансформация монотерпеноидов с использованием грибов	36
1.5. Биологическая трансформация монотерпеноидов с использованием личинок насекомых	39
1.6. Актиномицеты как перспективный объект для биотрансформации гидрофобных органических соединений.....	41
Экспериментальная часть.....	45
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Рабочая коллекция	45
2.2. Условия культивирования.....	45
2.3. Химические реагенты	51
2.4. Микроскопические исследования	51
2.4.1. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия.....	51
2.4.2. Атомно-силовая (АСМ) и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)	52
2.4.3. Сканирующая (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	52
2.5. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов	52
2.6. Иммобилизация бактериальных клеток.....	53
2.7. Локализация ферментных систем.....	54

2.8. Жизнеспособность бактериальных клеток	54
2.9. Электрокинетический потенциал	55
2.10. Внутриклеточные липидные включения	55
2.11. Респираторная активность	56
2.12. Каталазная активность.....	56
2.13. Полногеномное секвенирование.....	57
2.14. Биоинформатический анализ	57
2.15. Выделение нуклеиновых кислот	58
2.16. ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени.....	58
2.17. Детекция нуклеиновых кислот	59
2.18. Определение относительного уровня экспрессии генов.....	60
2.19. Цифровая ПЦР	61
2.20. Качественный и количественный анализ (–)-изопулегола и его метаболитов	62
2.21. Химический синтез	66
2.22. <i>In silico</i> анализ продуктов биотрансформации (–)-изопулегола	67
2.23. Фитотоксичность (–)-изопулегола и его метаболитов	67
2.24. Антимикробная активность	68
2.25. Анальгетическая активность	68
2.26. Статистическая обработка результатов	69
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К ТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА	70
Глава 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	73
Глава 5. ВЛИЯНИЕ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ ...	82
Глава 6. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА	90
Глава 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫЕ В БИОТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	127

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

ВВЕДЕНИЕ

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. 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, неограниченная доступность и широкое разнообразие биологических свойств (–)-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; Ilyina *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. Однако 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 биокатализаторов 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 – выявить способность 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.org.ru>) впервые показана способность актиномицентов 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 анальгетическая 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 СYP450-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.

Теоретическая и практическая значимость 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 – (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола и (1R,3R,4S)-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. На основе полученного (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола синтезировано соединение с выраженным обезболивающим эффектом. Экспериментально обосновано участие цитоплазматических ферментных комплексов семейства СYP450 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 2796679 на изобретение Российской Федерации. Разработан эффективный биокатализатор на основе иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, обеспечивающий интенсификацию процесса получения целевых производных (–)-изопулегола в заданных условиях. Разработка защищена Патентом 2855467 Российской Федерации. 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.iegmc.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 методов высокочувствительной респирометрии, измерения электрокинетического потенциала и каталазной активности. В работе использовали методы, относящиеся к различным типам микроскопии, включая фазово-контрастную, флуоресцентную, атомно-силовую, конфокальную лазерную сканирующую, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, а

также рентгеновской спектроскопии. Локализацию ферментных систем, участвующих в биотрансформации (–)-изопулегола, проводили путем выделения отдельных клеточных фракций родококков. Детекцию и идентификацию продуктов биотрансформации 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.

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 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)циклогексано́л 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)циклогексано́ла 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; IV Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания, 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 РНФ (№ 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» Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. – д.б.н. Мулюкин А.Л.). Идентификацию продуктов трансформации методами газовой хромато-масс спектрометрии и ЯМР-спектроскопии осуществляли на базе лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН (рук. – д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Салахутдинов Н.Ф.). 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.

Глава 1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ МОНОТЕРПЕНОИДОВ

1.1. Химические свойства и распространение в природе

Терпены – широко распространённые в природе соединения, углеводороды, содержащие в своём углеродном скелете два изопреновых фрагмента (C_5H_8), каждый из которых состоит из пяти атомов углерода. По количеству изопреновых звеньев в молекуле терпены подразделяют на моно-, сескви-, ди-, три-, тетра- и политерпены (Рисунок 1). Кислородсодержащие производные терпенов, такие как спирты, альдегиды, кетоны и кислоты, называют терпеноидами (Семёнов, 2000). Однако зачастую два этих термина используются как синонимичные.

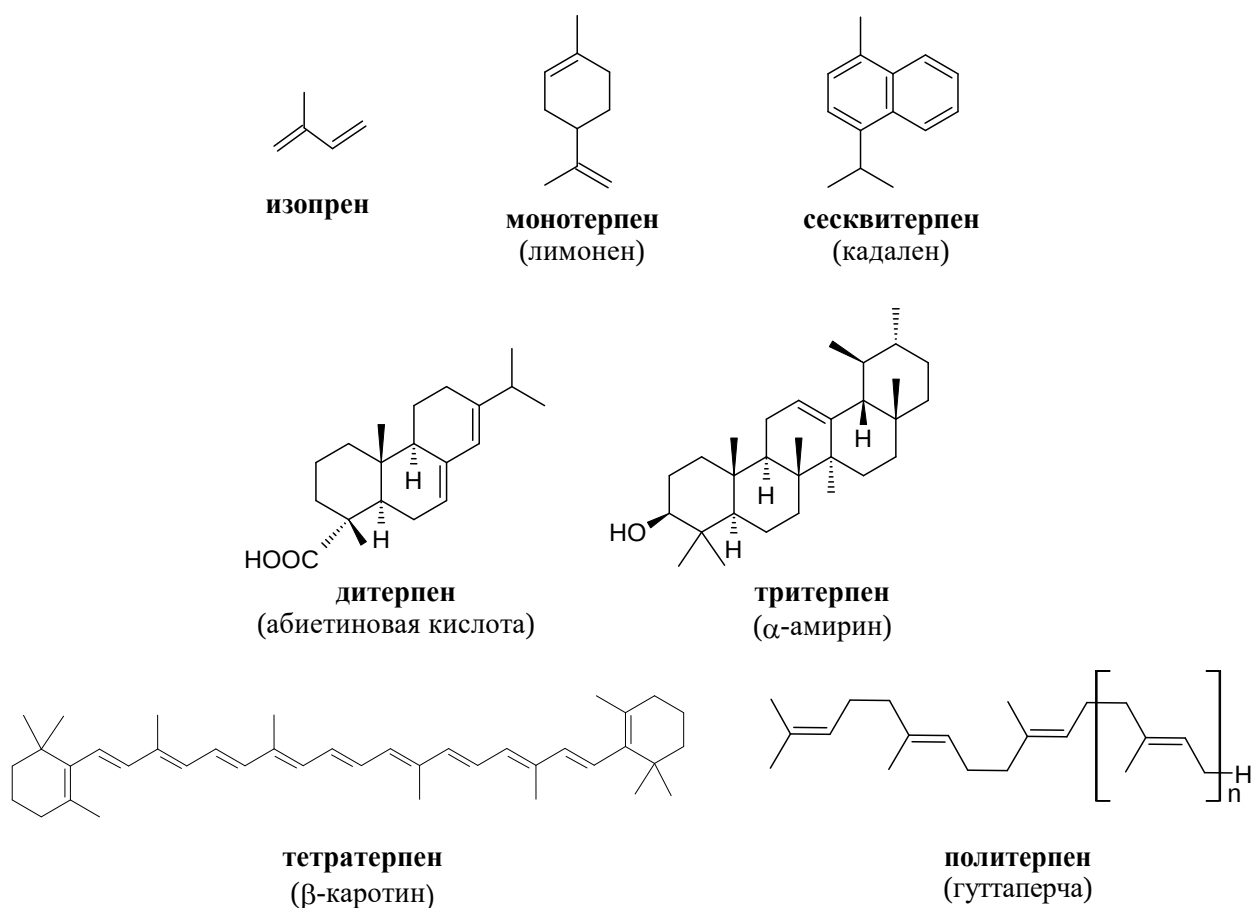


Рисунок 1 – Структурное разнообразие терпенов (Maltseva *et al.*, 2024*)

Наиболее распространенными в растительных источниках являются представители группы монотерпеноидов. По строению углеродного скелета монотерпеноиды подразделяют на ациклические (имеют нециклическую

* Здесь и далее – ссылка на публикации по теме диссертации

углеродную цепь и содержат три двойных связи), моноциклические (содержат один цикл и две двойные связи) и бициклические (содержат два цикла и одну двойную связь). Для большинства терпеноидов характерна стереоизомерия: лево- и правовращающиеся формы обозначаются как (–)- и (+)-изомеры, соответственно. Монотерпеноиды составляют до 90% эфирных масел растений, характеризуются большим разнообразием химических структур (Bakkali *et al.*, 2008) и широко применяются в косметологии, пищевой промышленности, фармакологии и сельском хозяйстве. При этом нативные соединения обладают высокой гидрофобностью и летучестью, а также выраженной цитотоксичностью, что затрудняет их промышленное использование (Schempp *et al.*, 2020).

Основными источниками монотерпеноидов являются растения семейств Сложноцветные (Compositae), Яснотковые (Labitae), Миртовые (Myrtaceae), Сосновые (Pinaceae), Рутовые (Rutaceae) и Зонтичные (Umbelliferae). В незначительных количествах монотерпеноиды обнаруживаются в бактериях, грибах, водорослях, насекомых и даже высших животных (Племенков, 2006). В Таблице 1 представлены данные о содержании наиболее распространенных монотерпеноидов в эфирных маслах различных растений. Высокие уровни лимонена характерны для цитрусовых (до 74,29% в *Citrus paradisi*), пинена – для хвойных (до 70,6% α -пинена в *Ferula kuhistanica*), 1,8-цинеола – для миртовых (71,77% в *Callistemon viminalis*), пулегона – для яснотковых (77,45% в *Origanum vulgare*). Концентрация и состав монотерпеноидов в растительных источниках существенно варьируют под влиянием внешних факторов, таких как освещенность, температура, влажность, состав почвы и ландшафт. Кроме того, содержание монотерпеноидов зависит от вида и возраста растения. Так, исследования динамики эмиссии монотерпеноидов хвойных пород выявили различия в соотношении α - и β -пинена, лимонена и камфена в зависимости от возраста растений и сезона (Kim *et al.*, 2005). Для камелии (*Camellia japonica*) и корейской сосны (*Pinus koraiensis*) характерно увеличение эмиссии у растений старшего возраста, в то время как максимальные выбросы монотерпеноидов у японского кипариса (*Chamaecyparis obtusa*) наблюдались у молодых деревьев. При этом для

всех изученных видов эмиссия монотерпеноидов возрастала в весенне-летний период.

Таблица 1 – Распространение монотерпеноидов в эфирных маслах растений

Источник	Часть растения	Содержание, %	Литературный источник
Лимонен			
<i>Carum carvi</i> L.	Семена	16,15–29,11	(Laribi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Кожура плодов	40,19	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	Кожура плодов	56,30	
<i>Citrus paradisi</i> Macfad.	Кожура плодов	74,29	
<i>Lippia schaueriana</i> (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson	Листья	8,06	(Vieira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Листья	14,10	(Danielli <i>et al.</i> , 2019)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Листья	1,08	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Листья	4,91	
<i>Agastache rupestris</i> (Greene) Standl.	Побег	2,86	(Романова, Бузук, 2020)
<i>Agastache aurantiaca</i> (A. Gray) Lint & Epling	Побег	5,45	
<i>Schinus areira</i> L.	Листья	45,95	(Wannaz <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Хвоя	12,41	(Sakhno <i>et al.</i> , 2021)
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Листья	7,3	(Malankina <i>et al.</i> , 2025)
Карвон			
<i>Carum carvi</i> L.	Семена	61,58–77,35	(Laribi <i>et al.</i> , 2013)
α-Пинен			
<i>Callistemon viminalis</i> (Sol. ex Gaertn.) G. Don.	Листья	11,47	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ferula kuhistanica</i> Korov.	Корни	57,7–70,6	(Khalifaev <i>et al.</i> , 2018)

Продолжение Таблицы 1

Источник	Часть растения	Содержание, %	Литературный источник
<i>Laurus nobilis</i> L.	Листья	5,8	(Caputo <i>et al.</i> , 2017)
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Листья	14,80	(Danielli <i>et al.</i> , 2019)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Листья	15,12	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Листья	35,49	
<i>Schinus areira</i> L.	Листья	5,20	(Wannaz <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Хвоя	21,20	(Sakhno <i>et al.</i> , 2021)
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Хвоя	11,18–18,3	(Neverova, Tsandekova, 2017)
<i>Juniperus communis</i> L.	Побег	26,94–27,52	(Герлинг и др., 2016)
β-Пинен			
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Кожура плодов	19,65	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	Кожура плодов	8,81	
<i>Curcuma caesia</i> Roxb.	Корневище	27,5	(Angel <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ferula kuhistanica</i> Korov.	Корни	8,2–27,1	(Khalifaev <i>et al.</i> , 2018)
<i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	Листья	15,50	(Danielli <i>et al.</i> , 2019)
<i>Nepeta binaloudensis</i> Jamzad	Побег	1,8-10,4	(Amirmohammadi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Schinus areira</i> L.	Листья	5,15	(Wannaz <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Хвоя	29,57	(Sakhno <i>et al.</i> , 2021)
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Листья	0,31	(Malankina <i>et al.</i> , 2025)
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Хвоя	0,95–1,72	(Neverova, Tsandekova, 2017)
<i>Juniperus communis</i> L.	Побег	22,14–22,56	(Герлинг и др., 2016)

Продолжение Таблицы 1

Источник	Часть растения	Содержание, %	Литературный источник
1,8-Цинеол			
<i>Artemisia judaica</i> L.	Листья	4,91	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Artemisia serotina</i> Bunge	Побег	10,08	(Мухаматханова и др., 2017)
<i>Artemisia sogdiana</i> Bunge	Побег	28,13	
<i>Callistemon viminalis</i> (Sol. ex Gaertn.) G. Don	Листья	71,77	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Curcuma aromatica</i> Salisb.	Корневище	10,1	(Angel <i>et al.</i> , 2014)
<i>Curcuma malabarica</i> Velay., Amalraj & Mural.	Корневище	40,8	
<i>Curcuma rakthakanta</i> Mangaly & M. Sabu	Корневище	24,6	
<i>Laurus nobilis</i> L.	Листья	31,9	(Caputo <i>et al.</i> , 2017)
<i>Nepeta assurgens</i> Hausskn. & Bornm.	Побег	16,8-24,1	(Amirmohammadi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Nepeta binaloudensis</i> Jamzad	Побег	14,8-19,6	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Листья	19,60	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
Пулегон			
<i>Origanum vulgare</i> L.	Листья	77,45	(Elansary <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ziziphora pamiroalaica</i> Juz.	Листья	52,7-60,4	(Akobirshoeva, Olennikov, 2017)
<i>Agastache aurantiaca</i> (A. Gray) Linton & Epling	Побег	7,99	(Романова, Бузук, 2020)
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Листья	65,35	(Malankina <i>et al.</i> , 2025)
Изопулегол			
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	Листья	53,0	(Rao <i>et al.</i> , 2003)

Окончание Таблицы 1

Источник	Часть растения	Содержание, %	Литературный источник
<i>Melissa officinalis</i> L.	Листья	22,02	(Bounihi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Agastache aurantiaca</i> (A. Gray) Linton & Epling	Побег	1,56	(Романова, Бузук, 2020)
<i>Eucalyptus tereticornis</i> Sm.	Листья	53,53	(Khaiper <i>et al.</i> , 2026)
Ментол			
<i>Agastache aurantiaca</i> (A. Gray) Linton & Epling	Побег	35,22	(Романова, Бузук, 2020)
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Листья	0,48	(Malankina <i>et al.</i> , 2025)

В растениях монотерпеноиды выполняют функцию защиты от окислительного стресса, фитопатогенов, различных абиотических факторов, а также принимают участие во взаимодействии растений с опылителями (Tholl, 2015). Биосинтез терпеноидов в растениях основан на образовании изопреновых молекул-предшественников изопентенилдифосфата (IPP) и диметилаллилдифосфата (DMAPP) с последующими их структурными модификациями при воздействии терпенсинтаз. В растительных клетках эти соединения образуются двумя независимыми путями: мевалонатным (MVA), локализованным преимущественно в цитозоле, и 2-С-метил-*D*-эритритол-4-фосфатным (MEP) в пластидах. При этом MEP-путь является основным источником IPP и DMAPP для биосинтеза монотерпеноидов, тогда как MVA-путь обеспечивает преимущественно синтез сесквитерпеноидов и тритерпеноидов (Vranová *et al.*, 2013). Под действием фермента геранилдифосфатсинтазы молекулы IPP и DMAPP конденсируются с образованием геранилдифосфата (GPP), который является непосредственным субстратом для монотерпенсинтаз (Рисунок 2). В ходе дальнейших ферментных модификаций (циклизаций,

перегруппировок и элиминирования) формируются ациклические, моноциклические или бициклические монотерпеноиды.

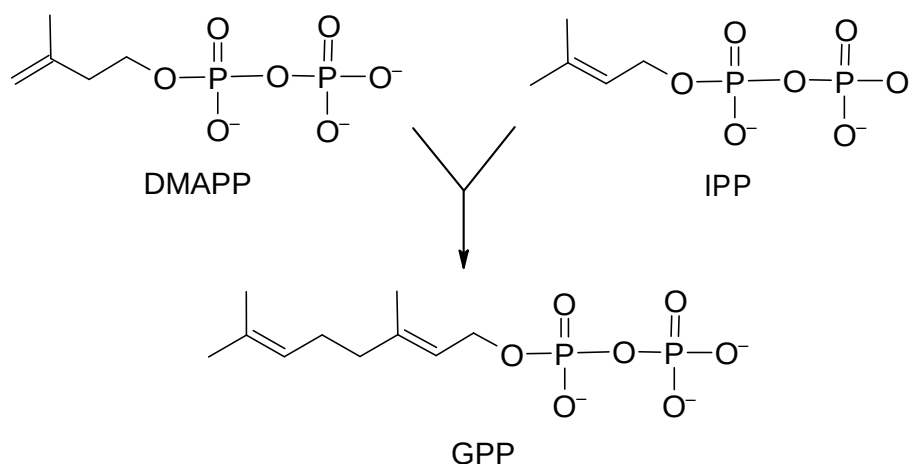


Рисунок 2 – Основные молекулы-предшественники биосинтеза монотерпеноидов

Помимо растений, биосинтез монотерпеноидов способны осуществлять и другие группы организмов: бактерии, археи и грибы. Для грибов и архей характерно использование MVA-пути, тогда как для большинства видов бактерий – МЕР-путь (Hu *et al.*, 2024). При этом МЕР-путь считается более эффективным, так как требует меньше энергетических затрат и обеспечивает более высокий выход углерода.

1.2. Биологическая активность монотерпеноидов и их производных

Природные монотерпеноиды и их производные представляют большой интерес как биологически активные соединения, перспективные для биотехнологического использования в пищевой промышленности, парфюмерии и фармакологии. Благодаря небольшому размеру молекул монотерпеноиды способны проникать через гематоэнцефалический барьер. На сегодняшний день опубликовано множество детальных обзоров биологических свойств отдельных монотерпеноидов (Khaleel *et al.*, 2018; Mukhtar *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2018; Périco *et al.*, 2020; Zielińska-Błajet, Feder-Kubis, 2020; Allenspach, Steuer, 2021; Silva *et al.*, 2021; Mołdoch *et al.*, 2025). Выявлено антиоксидантное, антимикробное, антидиабетическое, противоопухолевое, обезболивающее, противовоспалительное и противовирусное действие монотерпеновых экстрактов, выделенных из различных растительных источников.

Наиболее подробно изучена противомикробная активность монотерпеноидов. Они проявляют бактерицидное, фунгицидное и антибиопленочное действие в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp.) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), в том числе в отношении антибиотико-резистентных штаммов, а также грибных патогенов (*Candida albicans*, *C. auris*, *Aspergillus* spp.) (Kong *et al.*, 2025). Основные механизмы действия монотерпеноидов включают дестабилизацию цитоплазматической мембраны с нарушением ее проницаемости, утечкой ионов и АТФ, ингибирование образования биопленок, подавление экспрессии генов вирулентности и эффлюксных насосов, а также индукцию окислительного стресса. Такие монотерпеноиды как лимонен, β -мирцен, гераниол и цитронеллол также проявляют выраженную противомикробную активность в отношении бактерии *Helicobacter pylori*, которая является возбудителем инфекций пищеварительной системы (Périco *et al.*, 2020).

Биологические свойства эфирных масел растений зачастую ассоциированы с высоким содержанием в них монотерпеноидов. Эфирное масло, богатое

α -пиненом, проявляет выраженные антибактериальные свойства в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Ojeda-Sana *et al.*, 2013). Способность эфирного масла розмарина *Rosmarinus officinallis* L. к противогрибковому действию, вероятно, обусловлена присутствием в нём 1,8-цинеола, камфоры и α -пинена (Elansary *et al.*, 2018). Установлено, что сезонное снижение концентрации лимонена, α - и β -пинена в листьях *Nectandra megapotamica* приводит к ослаблению противогрибковой активности экстракта (Danielli *et al.*, 2019). Антибактериальная (минимальная подавляющая концентрация (МПК) 0,11–0,76 мг/мл) активность душицы *Origanum vulgare* L. в отношении *B. cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Dickeya solani* и *E. coli* может быть связана с большим содержанием в ней монотерпеноида пулегона (Elansary *et al.*, 2018).

Важно отметить выраженное синергическое действие монотерпеноидов в сочетании с традиционными антибиотиками (ванкомицин, меропенем, ципрофлоксацин), что позволяет снижать рабочие концентрации препаратов и обходить механизмы резистентности микроорганизмов (Kong *et al.*, 2025).

Выявлена высокая токсичность (–)-лимонена (LD_{50} 32 мкл/л), содержащегося в сосне, по отношению к жуку-короеду *Dendroctonus ponderosae* (Chiu *et al.*, 2017). Показано, что лимонен и его метаболиты обладают широким спектром биологической активности: противовоспалительной, антиоксидантной, антиноцицептивной, противоопухолевой, противодиабетической, противовирусной и гастропротекторной (Mukhtar *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2018).

Антиоксидантная активность душицы (IC_{50} 2,8 мг/л) и розмарина (IC_{50} 11 мг/л) обусловлена значительным количеством в их составе пулегона и мирцена, соответственно (Ojeda-Sana *et al.*, 2013; Elansary *et al.*, 2018). По данным группы учёных во главе с I. Tagnaout (2022), обнаруженная высокая антиоксидантная активность эфирных масел тимьяна связана с большим содержанием в них оксигенированных монотерпенов и монотерпеновых углеводов (Tagnaout *et al.*, 2022).

Сообщалось о перспективе использования α -пинена в качестве нейропротектора. Введение монотерпеноида в дозах 100 и 200 мг/кг способствует улучшению памяти и снижению двигательных расстройств у мышей с болезнью Паркинсона (Goudarzi and Rafieirad, 2017). Кроме того, α -пинен задерживает время начала и сокращает продолжительность пентилентетразол-индуцированных судорог у крыс (Zamyad *et al.*, 2019).

Карвон обладает антидиабетическим действием, повышая активность ферментов углеводного обмена у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом (Muruganathan and Srinivasan, 2016). Известно, что карвон ингибирует пролиферативную активность клеток меланомы (Kang *et al.*, 2020). Кроме того, *R*-(-)-карвон способен оказывать синергическое противоопухолевое действие с антибиотиком доксорубицином, снижая его кардиотоксичность (Abbas *et al.*, 2020). *D*-карвон имеет терапевтический потенциал в качестве противовоспалительного агента при артрите (Chen *et al.*, 2020).

Фенольный монотерпеноид карвакрол обладает выраженными противомикробными (Gavaric *et al.*, 2015; Trevisan *et al.*, 2018), противораковыми (Baranauskaite *et al.*, 2017), противовоспалительными, противоязвенными (Silva *et al.*, 2012), противопаразитарными (Hikal *et al.*, 2021) и инсектицидными (Torres-pag *et al.*, 2024) свойствами.

Перспективным соединением для использования в фармацевтике является и монотерпеновый спирт α -терпинеол, обладающий широким спектром биологической активности: антиоксидантная, противораковая, антиноцицептивная (обезболивающая), кардиоваскулярная, противогипертоническая, противоязвенная, противобронхитная, седативная и инсектицидная (Khaleel *et al.*, 2018).

Несмотря на широкий спектр описанной биологической активности нативных монотерпеноидов, их практическое применение ограничено высокой летучестью и высокой степенью гидрофобности, что связано с их химической структурой и свойствами, и, как следствие, низкой биодоступностью. В связи с этим монотерпеноиды представляют значительный интерес в качестве

«молекулярных скаффолдов» – структурных каркасов для синтеза биологически активных производных. Присоединение к их карбоскелету разнообразных функциональных групп или боковых цепей позволяет конструировать соединения с улучшенной биодоступностью и целевой биоактивностью, что открывает перспективы для разработки новых терапевтических агентов (Moldoch *et al.*, 2025). Особое внимание исследователей сосредоточено на асимметрическом синтезе хиральных лигандов и оптически активных соединений на основе нативных терпеноидов. Результатом этих работ стало внедрение в практику органического синтеза разнообразных производных α -пинена, *L*-ментола, *L*- и *D*-камфоры, многие из которых нашли применение в качестве высокоэффективных, но при этом дорогостоящих промышленных хиральных реагентов (Волчо и др., 2005).

Особое внимание обращено на асимметрический синтез хиральных лигандов и оптически активных соединений на основе нативных терпеноидов. Результатом чего стало введение в практику асимметрического синтеза производных α -пинена, *L*-ментола, *L*- и *D*-камфоры и других монотерпеноидов, многие из которых при этом очень дорогостоящие.

Синтезированные эфиры тимола проявляют значительно более выраженную (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) 11,7 мкг/мл) антибактериальную активность в отношении *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* и *S. epidermidis* по сравнению с исходным монотерпеноидом (Mathela *et al.*, 2010).

Сообщалось о цитотоксической активности галогенированных монотерпеноидов, полученных из красной водоросли *Plocamium cartilagineum*, по отношению к раковым клеткам лёгких NCI-H460 (IC₅₀ 4 мкг/мл), а также крови и кишечника человека (IC₅₀ 1,3 мкг/мл) (Sabry *et al.*, 2017).

Присоединение к молекуле ментона пиримидиновых и мочевиновых (карбамидных) функциональных групп позволяет получить соединения, способные индуцировать апоптоз клеток HeLa (Huang *et al.*, 2022).

Интересные результаты получены при модификации β -пинена присоединением метилгидросульфанилацетата к его двойной связи (Fedyunina *et*

al., 2019). Синтезированный таким образом сульфид полностью подавлял агрегацию тромбоцитов, что открывает перспективы его применения в качестве антитромбоцитарного средства.

В последние два десятилетия значительный объём данных о биологической активности накоплен относительно монотерпенового спирта изопулегола и его производных. Изопулегол демонстрирует широкий спектр биоактивности, включающий нейротропные (Silva *et al.*, 2007), противосудорожные (Silva *et al.*, 2009), антиноцицептивные (Próspero *et al.*, 2018), противовоспалительные (Ramos *et al.*, 2020), гастропротекторные (Silva *et al.*, 2009a), антиоксидантные (Silva *et al.*, 2009; Sankaranarayanan, Kalaivani, 2020), противомикробные (Silva *et al.*, 2024) и нейропротекторные (Kang *et al.*, 2021) эффекты. Особый интерес представляют синтетические производные изопулегола – аминокдиолы, аминоктриолы, октагидро-2Н-хромен-4-олы и их гетероциклические аналоги, которые проявляют высокую противоопухолевую (Le *et al.*, 2018, 2024; Vamou *et al.*, 2022) и противовирусную (Ilyina *et al.*, 2018) активность, что делает изопулегол перспективной стартовой молекулой для направленного синтеза новых биологически активных соединений.

1.3. Биотрансформация монотерпеноидов с использованием бактерий

1.3.1. Использование биохимического потенциала целых бактериальных клеток

Использование нативных бактериальных клеток в биокатализе является экономически более выгодным по сравнению с применением трансформирующих ферментных систем или индивидуальных ферментов. Несмотря на исключительную, казалось бы, селективность и субстратную специфичность отдельных ферментов использование их ограничивается низкой устойчивостью и узким кругом метаболизируемых субстратов. Спектр веществ, которые могут превращаться целыми бактериальными клетками, намного шире. Их использование позволяет проводить сложные превращения в одну технологическую стадию, с высокой степенью селективности и в экологически безопасных условиях. Кроме того, бактерии секретируют необходимые кофакторы и обеспечивают естественную среду для ферментов, предотвращая конформационные изменения в структуре белков и потерю их реакционной активности (de Carvalho, da Fonseca, 2011). Таким образом, специфика многоцелевых ферментных систем, отсутствие проблемы регенерации коферментов, устойчивая активность в экстремальных условиях внешней среды – всё это делает использование живых клеток микроорганизмов в процессах биокатализа технологически перспективным.

На данный момент накоплен достаточно большой объём знаний о микробных трансформациях монотерпеновых соединений с использованием бактерий, грибов и даже личинок насекомых. Подавляющее большинство описанных исследований по биоконверсии посвящено трансформации таких монотерпеновых субстратов как лимонен, карвеол, 1,8-цинеол и др. Лишь в последние годы прослеживается тенденция к изучению реакций превращений более сложных циклических монотерпеновых соединений (Maltseva *et al.*, 2024*). При этом в качестве биокатализаторов чаще всего используются грамположительные актиномицеты рода *Rhodococcus* и грамотрицательные протеобактерии рода *Pseudomonas*.

Первые сведения о каталитической активности *Rhodococcus* spp. в отношении терпеноидов были получены в конце 80-х годов прошлого века. Уже в то время большое внимание уделялось не только технологическому процессу конверсии и его оптимизации, но и особенностям ферментных систем микроорганизмов, принимающих участие в исследуемых превращениях. D.R. Williams с соавт. (1989) сообщили о выделенном штамме *Rhodococcus* sp. C1, который при росте на 1,8-цинеоле (**1**) в качестве единственного источника углерода накапливал 6-эндо-гидроксицинеол (**2**) и 6-оксоцинеол (**3**) (Williams *et al.*, 1989) (Рисунок 3). В дальнейшем полученные метаболиты вместе с исходным субстратом подвергались окислению отмытыми бактериальными клетками. Также в ходе исследований были обнаружены 6-эндо-гидроксицинеол дегидрогеназа и НАДН-зависимая 6-оксоцинеол оксигеназа, предположительно принимающие участие в конверсии.

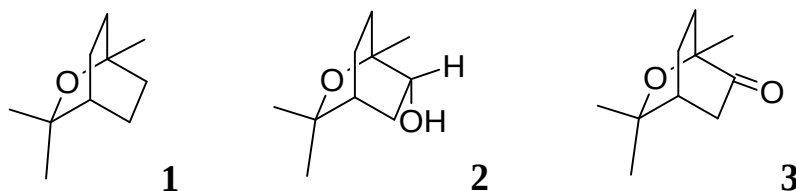


Рисунок 3 – Структурные формулы соединений **1–3**

Показано, что *R. opacus* PWD4 способен проводить толуол-индуцированное энантиоселективное гидроксирование *D*-лимонена (**4**) с образованием (+)-*транс*-карвеола (до 97%) (**5**) и небольших количеств (+)-карвона (**6**) (Рисунок 4). Было выдвинуто предположение о возможном участии в катализе толуол-деградирующих ферментов, поскольку смена косубстрата с толуола на глюкозу привела к потере трансформационной активности родококков в отношении лимонена (Duetz *et al.*, 2001).

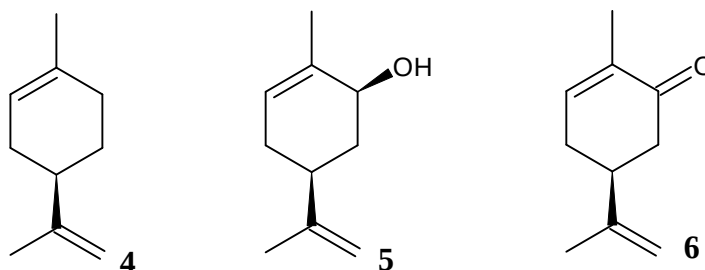


Рисунок 4 – Структурные формулы соединений **4–6**

Обширная серия исследований, выполненных различными научными группами, посвящена каталитической активности штамма *R. erythropolis* DCL14 в отношении монотерпеноидов лимонен-1,2-эпоксида, карвеола и лимонена. Первые данные об этом штамме как эффективном биотрансформаторе (+)-лимонена представлены M.J. van der Werf и J.A.M. de Bont в 1998 г. (Werf, Bont, 1998). Полученные в ходе деградации промежуточные продукты оксид лимонена и *n*-мент-7-ен-1,2-диол не представляли большой биотехнологической ценности, однако позволили расширить представление о путях микробной метаболизации лимонена и создать задел для будущих исследований.

В дальнейшем исследовательской группой во главе с Carla C.C.R. de Carvalho (Португалия) были подобраны оптимальные условия использования нативных клеток *R. erythropolis* DCL14. Так, включение в систему реакции органического растворителя, содержащего субстрат, позволило увеличить скорость гидролиза лимонен-1,2-эпоксида (7) до лимонен-1,2-диола (8), окисления (–)-карвеола (9) до карвона (6) и конверсию лимонена (4) до карвеола (9) и карвона (6) (Рисунок 5) (de Carvalho *et al.*, 2000; de Carvalho, da Fonseca, 2002, 2003).

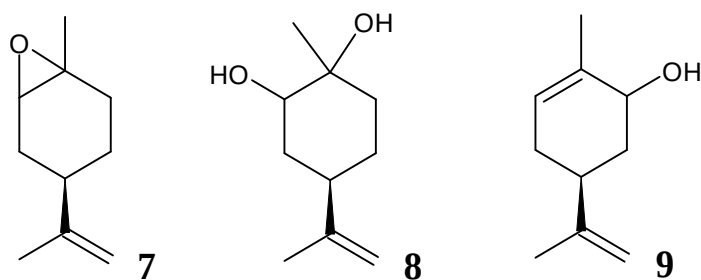


Рисунок 5 – Структурные формулы соединений 7–9

Выделенный из почвы штамм *Rhodococcus* sp. GR3 проводит окисление гераниола (10) до герановой кислоты (11) с выходом до 54,6% (см. Рисунок 1.6) (Chatterjee, 2004).

Выявлена способность нерастаущих клеток *R. erythropolis* MLT1 к трансформации ациклического монотерпена β-мирцена (12) (Рисунок 6) (Thompson *et al.*, 2010). На основе данного субстрата, использованного в качестве

единственного источника углерода, получен монотерпеновый спирт гераниол (10), широко применяемый в парфюмерии, пищевой промышленности и как репеллент от насекомых. По предварительным данным, процесс деградации мирцена связан с участием ферментов альдегиддегидрогеназы и ацил-КоА-дегидрогеназы, свойственных для углеводородокисляющих родококков.

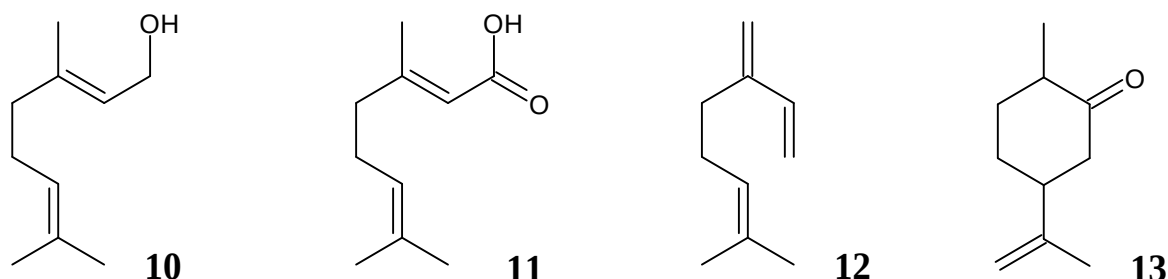


Рисунок 6 – Структурные формулы соединений 10–13

Помимо актиномицетов, к биотрансформации монотерпеноидов проявляют способность и грамотрицательные бактерии. Так, сообщалось о получении *транс*-дигидрокарвона (13) из лимонена (4) с помощью выделенного из апельсиновой кожуры штамма *Klebsiella* sp. O852 (Chen *et al.*, 2021).

Значительный объем научных данных накоплен в отношении микробной трансформации монотерпеноидов с использованием представителей рода *Pseudomonas*. Исследования бактериальной трансформации монотерпеноидов инициированы в 1960-х годах работами с культурой *P. citronellolis*, показавшими её активность в отношении цитронеллола и фарнезола (Seubert, 1960). Культура *P. putida* S4-2 инициировала процесс минерализации β -мирцена (12) путем терминального гидроксирования с образованием (*E*)-мирцен-8-ола (14), с последующей его конверсией в (*E*)-2-метил-6-метилен-2,7-октадиеновую (мирценовую) кислоту (15), 4-метилен-5-гексеновую кислоту (16) и (*E*)-4-метил-3-гексеновую кислоту (17) (Narushima *et al.*, 1981) (Рисунок 7).

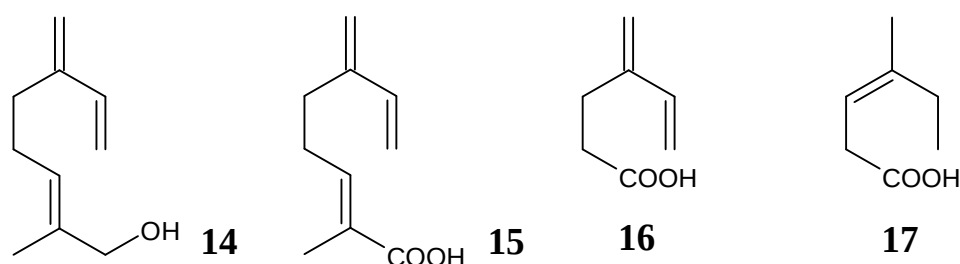


Рисунок 7 – Структурные формулы соединений 14–17

Сообщалось также о конверсии бициклических монотерпенов α - (18) и β -пиненов (19) бактериями *Pseudomonas* sp. PIN с образованием лимонена (4), *n*-цимола (20), α -терпинолена (21), камфоры (22), терпинен-4-ола (23), α -терпинеола (24), эндоборнеола (25), *n*-цимол-8-ола (26) и фенхилового спирта (27) (Рисунок 8) (Yoo *et al.*, 2001).

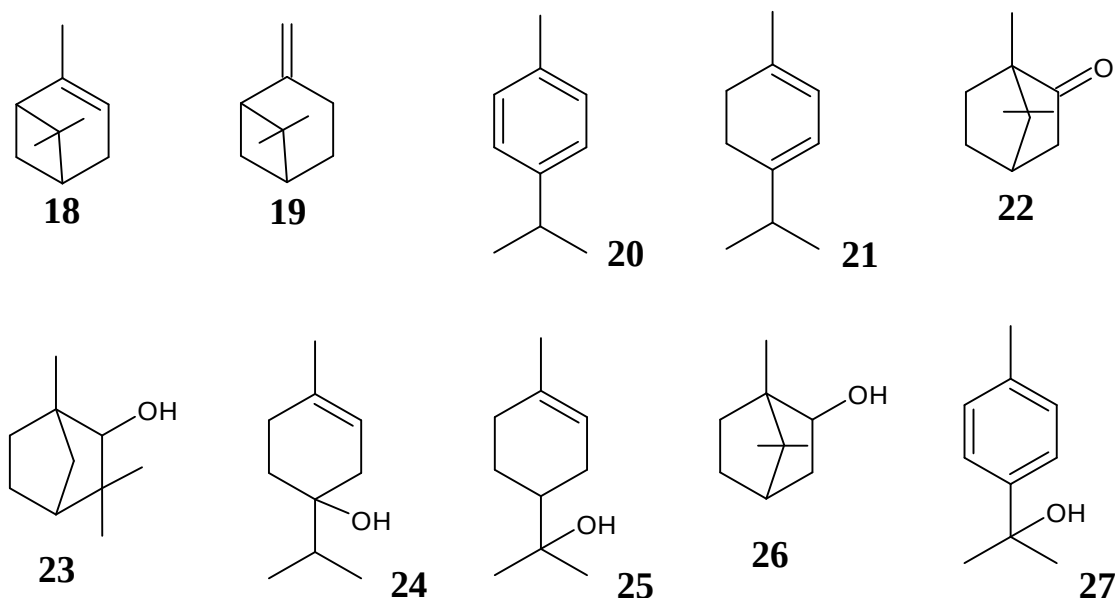


Рисунок 8 – Структурные формулы соединений 18–27

Исследована трансформирующая активность синегнойной палочки *P. aeruginosa* в отношении β -мирцена (12) (Esmaeili, Hashemi, 2011). Основными продуктами конверсии в течение 3 сут были 2,6-диметилоктан (28) (90,0 %) и α -терпинеол (24) (7,7%), в течение 1,5 сут – дигидролиналоол (29) (79,5%) и 2,6-диметилоктан (28) (9,3%) (Рисунок 9). При этом полученные производные активно используются в парфюмерной промышленности.

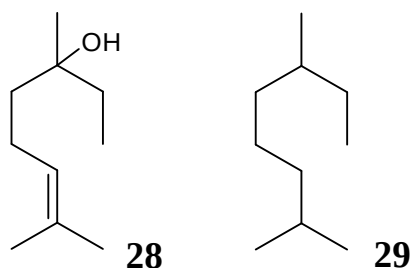


Рисунок 9 – Структурные формулы соединений 28, 29

Штамм *Pseudomonas* sp. L1B2P катализировал биотрансформацию цитронеллола (30) в смесь *цис*- (31) и *транс*-розеноксилов (32) (Рисунок 10),

ценных биоароматизаторов, с общим выходом продуктов до 29,67 мг/л (Pimentel *et al.*, 2012).

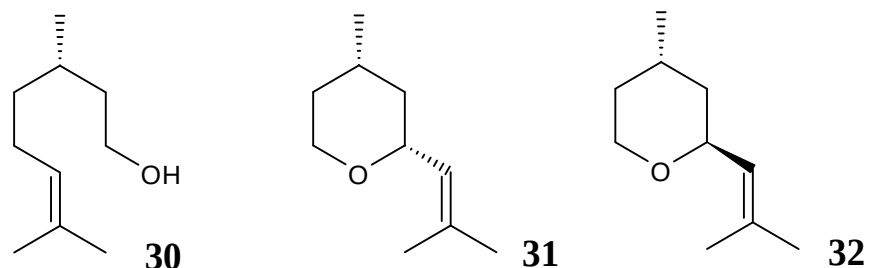


Рисунок 10 – Структурные формулы соединений **30–32**

Известно несколько путей трансформации лимонена (**4**) с использованием псевдомонад: *P. fluorescens* образовывал преимущественно α -терпинеол (**24**) (Bicas *et al.*, 2008), *P. incognita* – перилловую кислоту (**33**) (Рисунок 11) (Devi, Bhattacharyya, 1977), *P. gladioli* трансформировал *D*-лимонен с временным накоплением периллиловой кислоты и образованием α -терпинеола (Cadwaluder *et al.*, 1989).

Сообщалось о способности *P. rhodesiae* CIP107491 и *P. fluorescens* NCIMB 11671 к трансформации α -пинена (**18**) с образованием изоновалала (**34**) и новалала (**35**) (Bicas *et al.*, 2008). Предполагается, что дальнейшая трансформация происходит под действием НАД⁺-зависимой дегидрогеназы, окисляющей новалал до новалаловой кислоты (**36**), которая далее может метаболизироваться с образованием 3,4-диметилпентановой кислоты (**37**) (Linares *et al.*, 2009) (Рисунок 11).

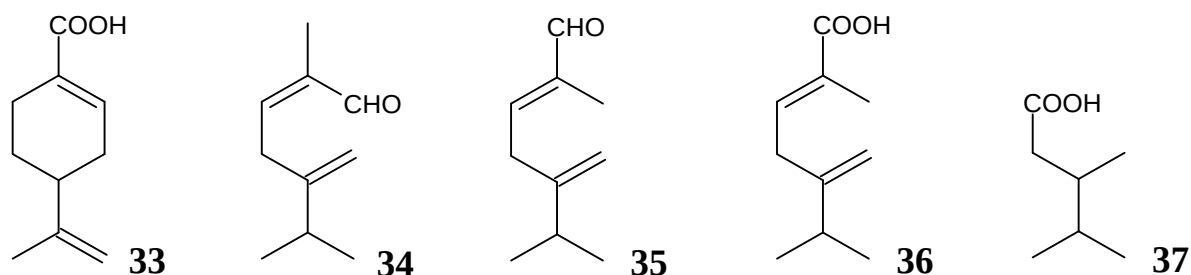


Рисунок 11 – Структурные формулы соединений **33–37**

Превращение α -пинена (**18**) бактерией *P. veronii* ZW происходило иным путем. Основными метаболитами в данном случае являлись *n*-цимол (**20**), 4-изопропилбензойная кислота (**38**), 4-изопропилпирокатехин (**39**), этандиовая

(щавелевая) кислота (**40**), этановая (уксусная) кислота (**41**) и изовалериановая кислота (**42**) (Рисунок 12) (Cheng *et al.*, 2012).

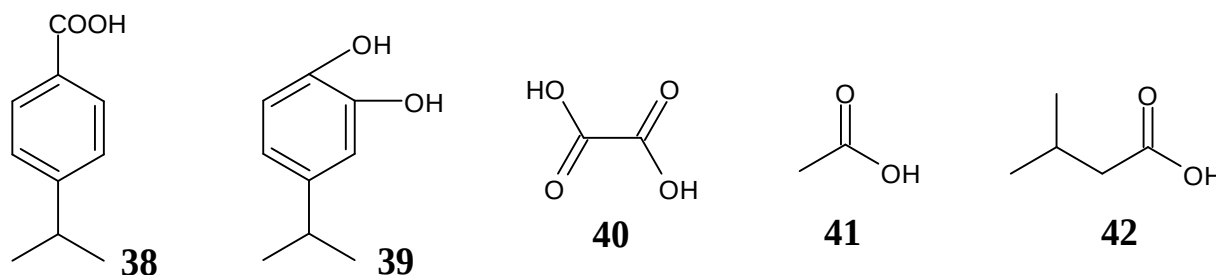


Рисунок 12 – Структурные формулы соединений **38–42**

Описаны также пути превращения монотерпеноидов с использованием анаэробных микроорганизмов. Так, штамм *Castellaniella defragrans* DSM 12143 катализирует гидратацию β -мирцена (**12**) до (S)-(+)-линалоола и его изомеризацию в гераниол (**10**) с последующим окислением до герановой кислоты (**11**) (Brodkorb *et al.*, 2010; Lüddecke, Harder, 2011). Аналогичный механизм был предложен для анаэроба *Thauera linaloolentis* DSM 12138 (Marmulla *et al.*, 2016).

1.3.2. Использование бактериальных ферментов

Способность бактериальных клеток к химическим превращениям различных соединений обусловлена действием их ферментных систем. Как следствие, логичной тенденцией в развитии биотехнологии является выделение и очистка бактериальных ферментов, а также их гиперэкспрессия в модельных организмах с целью масштабирования производства целевых веществ. Использование индивидуальных ферментов позволяет проводить высокоселективные реакции при многократном использовании, снижает требования к стерильности, а также упрощает процесс выделения и очистки целевого продукта (de Carvalho, da Fonseca, 2011). В связи с этим исследования каталитической активности бактерий в отношении терпеновых субстратов сопровождались анализом задействованных в превращениях микробных ферментов, а также кодирующих их функциональных генов.

В конце прошлого века голландскими микробиологами были получены сведения о новом пути биodeградации (4R)- и (4S)-изомеров лимонена (**4**) клетками *R. erythropolis* DCL14 (Van Der Werf *et al.*, 1999). В данных

превращениях лимонена принимали участие ферменты лимонен-1,2-монооксигеназа, лимонен-1,2-эпоксидгидролаза, лимонен-1,2-диолдегидрогеназа и 1-гидрокси-2-оксо-лимонен-1,2-монооксигеназа. Кроме того, был определен и гиперэкспрессирован в *E. coli* ген *limA*, кодирующий лимонен-1,2-эпоксидгидролазу (Barbirato *et al.*, 1998).

Той же исследовательской группой был выделен и очищен новый фермент из *R. erythropolis* DCL14 – никотинопротеин дихлорфенолиндофенол-зависимая карвеолдегидрогеназа, катализирующая окисление карвеола (5) в карвон (6), и выявлено лимонен- и карвеол-индуцированное специфическое действие данного фермента (Van Der Werf *et al.*, 1999).

В геноме штамма-биотрансформатора 1,8-цинеола (1) *R. jostii* TMP1 был выявлен ген *cinA1*, локализованный в опероне *Cin_{TMP1}* и кодирующий цитохром P450 (Jakubovska, Meškys, 2016). С использованием рекомбинантных клеток *E. coli* и *R. erythropolis* установлено, что данный фермент катализирует окисление 1,8-цинеола (1) до 6-кетоцинеола (3).

Выделенный из ризосферы эвкалипта *Eucalyptus* sp. штамм *R. globerulus* JDV-SF1993 содержит гены фермента CYP102N12, принадлежащего к группе цитохромов P450 (Giang *et al.*, 2022a). Установлено, что CYP108N12 катализирует региоспецифическое гидроксирование *n*-цимола (20), (*R/S*)-лимонена (4) и *n*-ксилола (43) до 4-изопропилбензилового спирта (44), периллилового спирта (45) и фенил-*n*-толилкетон (46) соответственно (Рисунок 13).

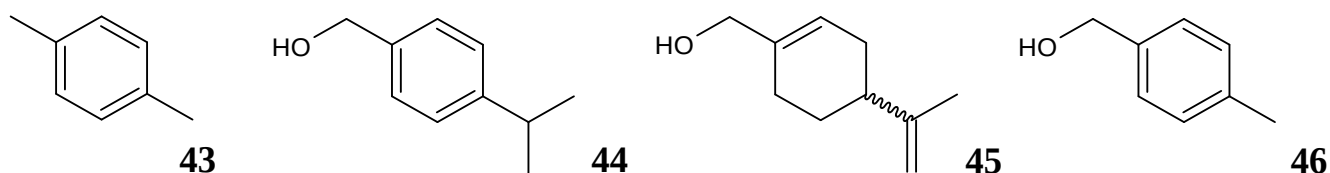


Рисунок 13 – Структурные формулы соединений 43–46

В последующих исследованиях генома *R. globerulus* JDV-SF1993 был выявлен ген, кодирующий CYP108N14 (Giang *et al.*, 2024). Данный фермент, подобно ранее описанному CYP102N12, гидроксировывает *n*-цимол (20) и (*R/S*)-лимонен (4), а также трансформирует (*S*)- α -терпинеол (24)

до (S)-7-гидрокситерпинеола (47) и (S)-4-терпинеол (48) до (S)-7-гидрокси-4-терпинеола (49) (Рисунок 14).

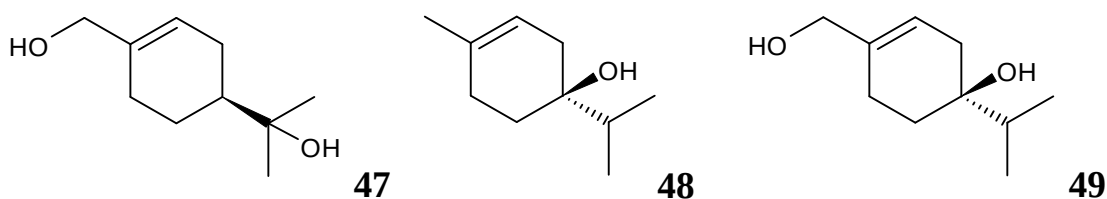


Рисунок 14– Структурные формулы соединений 47–49

Делеция гена 2,5-дикетокамфановой монооксигеназы *camE_{2,5}* в *P. monteilii* TCU-CK1 полностью блокировала деградацию борнеола (50) и образование ценного промежуточного продукта трансформации – камфоры (22). Применение мутантного штамма с нокаутами генов *camE_{2,5}* и *bdh1* восстановило способность клеток к трансформации и обеспечило накопление оптически чистого 2,5-дикетокамфана (51) из рацемического изоборнеола (52) с выходом 45% (Рисунок 15) (Hong *et al.*, 2024).

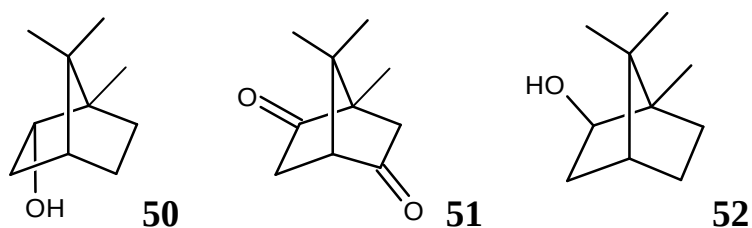


Рисунок 15– Структурные формулы соединений 50–52

Таким образом, исходя из анализа литературных данных, одними из наиболее перспективных промышленных биокатализаторов для трансформации монотерпеноидов являются бактерии рода *Rhodococcus* (Таблица 2). При этом наибольшая каталитическая активность характерна для представителей видов *R. erythropolis*, *R. globerulus* и *R. rhodochrous*. Другие культуры, используемые для биотрансформации (в частности, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. и др.), зачастую представлены патогенами, что требует особого внимания к аспектам биобезопасности при оценке их биотехнологической применимости.

Таблица 2 – Биотрансформация монотерпеноидов актиномицетами рода *Rhodococcus*

Субстрат	Штамм	Тип катализатора	Тип реакции	Продукты	Литературный источник
1,8-Цинеол	<i>Rhodococcus</i> sp. C1	Целые клетки	Гидроксилирование, окисление	6-эндо-Гидроксицинеол, 6-оксоцинеол	Williams <i>et al.</i> , 1989
	<i>R. josii</i> TMP1	Фермент P450 _{cin} (ген <i>cinA1</i>)	Окисление	6-Оксоцинеол	Jakubovska, Meškys, 2016
Лимонен	<i>R. opacus</i> PWD4	Целые клетки	Гидроксилирование, окисление	(+)- <i>транс</i> -Карвеол, (+)-карвон	Duetz <i>et al.</i> , 2001; de Carvalho, da Fonseca, 2003
	<i>R. erythropolis</i> DCL14	Целые клетки	Окисление	Лимонен оксид, <i>n</i> -мент-7-ен-1,2-диол	Werf, Bont, 1998
	<i>R. erythropolis</i> DCL14	Ферменты лимонен 1,2-монооксигеназа, лимонен-1,2-эпоксид гидролаза	Окисление, эпоксидирование	Лимонен-1,2-диол	Werf <i>et al.</i> , 1999
	<i>R. globerulus</i> JDV-SF1993	Ферменты CYP108N12, CYP108N14	Гидроксилирование	Периллиловый спирт	Giang <i>et al.</i> , 2022, 2024
Лимонен-1,2-эпоксид	<i>R. erythropolis</i> DCL14	Целые клетки	Гидролиз	Лимонен-1,2-диол	de Carvalho <i>et al.</i> , 2000
		Фермент лимонен-1,2-эпоксид гидролаза (ген <i>limA</i>)	Гидролиз	Лимонен-1,2-диол, гидрокси-2-оксолимонен, 3-изопропенил-6-оксогептаноат	Barbirato <i>et al.</i> , 1998

Окончание Таблицы 2

Субстрат	Штамм	Тип катализатора	Тип реакции	Продукты	Литературный источник
Карвеол	<i>R. erythropolis</i> DCL14	Целые клетки	Окисление	Карвон	de Carvalho, da Fonseca, 2002
		Фермент карвеол дегидрогеназа – CDH (ген <i>limC</i>)	Окисление	Карвон	Werf <i>et al.</i> , 1999
Гераниол	<i>Rhodococcus</i> sp. GR3	Целые клетки	Окисление	Герановая кислота	Chatterjee, 2004
β -Мирцен	<i>R. erythropolis</i> MLT1	Нерастущие клетки	Дегидрогенирование	Гераниол	Thompson <i>et al.</i> , 2010
<i>n</i> -Цимен	<i>R. globerulus</i> JDV-SF1993	Фермент CYP108N12, CYP108N14	Гидроксилирование	4- Изопропилбензиловый спирт	Giang <i>et al.</i> , 2022, 2024
(S)- α - Терпинеол	<i>R. globerulus</i> JDV-SF1993	Фермент CYP108N14	Гидроксилирование	(S)-7- Гидрокситерпинеол	Giang <i>et al.</i> , 2024
(S)-4- Терпинеол	<i>R. globerulus</i> JDV-SF1993	Фермент CYP108N14	Гидроксилирование	(S)-7-Гидрокси-4- терпинеол	Giang <i>et al.</i> , 2024

1.4. Биологическая трансформация монотерпеноидов с использованием грибов

Помимо бактериальных катализаторов, грибы также обладают значительным потенциалом для селективной трансформации монотерпеноидов в ценные ароматические и биологически активные соединения. Наиболее подробно изучены каталитические системы превращения лимонена и изомеров пинена с использованием плесневых и эндофитных грибов. Грибы преимущественно вводят гидроксильные и карбонильные группы, инициируя реакции гидроксирования, эпоксидирования и образования кетонов.

Описан процесс биотрансформации *R*-(+)-лимонена (**4**) посредством ферментации апельсиновых отходов эндофитными грибами *Diaporthe* sp. (César *et al.*, 2019). Основным продуктом после 6 суток ферментации является лимонен-1,2-диол (**8**) (2,66 г/кг субстрата). Также в качестве продуктов реакции были идентифицированы небольшие количества α -терпинеола (**3**) (0,44 г/кг субстрата), *транс*-карвеола (**5**) (0,13 г/кг субстрата) и *цис*-карвеола (**9**) (0,21 г/кг субстрата). При этом антиоксидантная активность полученного лимонен-1,2-диола значительно выше, чем у исходного соединения.

Способность к аэробной трансформации *R*-(+)-лимонена (**4**) в лимонен-1,2-диол (**8**) обнаружена и у фитопатогенных грибов *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864 (Sales *et al.*, 2019). Предположительно, промежуточным продуктом в данном процессе является лимонен-1,2-эпоксид (**7**).

Сравнительно большие количества α -терпинеола (**24**) и лимонен-1,2-диола (**8**) были получены в экспериментах по оптимизации конверсии *R*-(+)-лимонена и *S*-(-)-лимонена при использовании грибов *Fusarium oxysporum* 152В в качестве биокатализаторов (Molina *et al.*, 2015). При этом, продуктом анаэробной трансформации *R*-(+)-лимонена после 2 сут культивирования являлся α -терпинеол (**24**) (4 г/л). Биотрансформация *S*-(-)-лимонена протекала в аэробных условиях в течение 3 сут с образованием 3,7 г/л лимонен-1,2-диола (**8**).

Установлено, что грибы *Ceriporia* sp. ZLY-2010 и *Stereum hirsutum* способны проводить эффективную конверсию бициклического монотерпена

(–)- α -пинена (**18**) в течение 4 сут (Lee *et al.*, 2018). При использовании *Ceriporia* sp., в качестве основного продукта был получен α -терпинеол (**24**). Также среди метаболитов обнаруживались небольшие количества лимонена (**4**), фенхола (**53**), борнеола (**50**), 1-октен-3-ола (**54**), 3-октанона (**55**) и вербенон (**56**) (Рисунок 16). *S. hirsutum* катализировал превращение (–)- α -пинена (**14**) в вербенон (**56**), миртенол (**57**), камфору (**22**) и изопинокарвеол (**58**) (Рисунок 16).

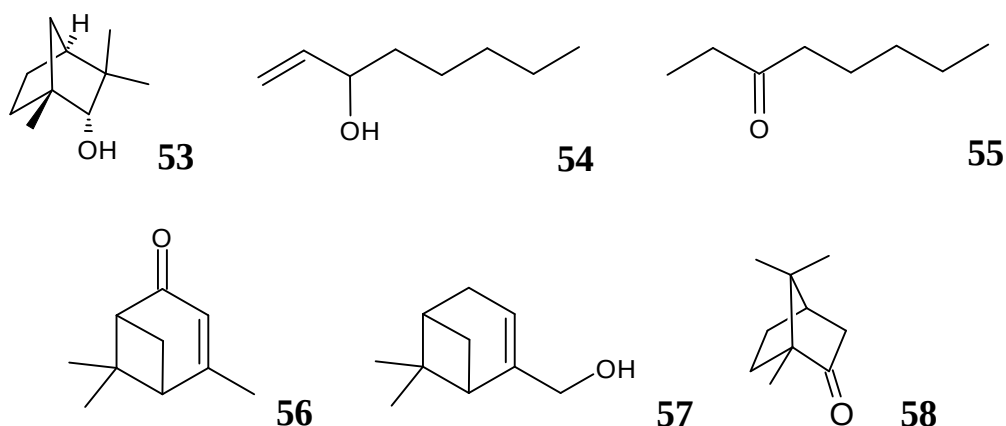


Рисунок 16 – Структурные формулы соединений **53–58**

Сообщалось о трансформирующей активности плесневых грибов *Aspergillus niger* ATCC 9642 по отношению к β -пинену (**15**) с образованием α -терпинеола (**20**) в качестве единственного продукта (Toniazzi *et al.*, 2005).

Нитчатые грибы *Mucor ramannianus* и *A. niger* способны катализировать стереоселективное гидроксирование 1 г/л 1,8-цинеола (**1**) с образованием 2-экзо-гидрокси-1,8-цинеола (**59**) и 3-экзо-гидрокси-1,8-цинеола (**60**) (Рисунок 17) (Ramos *et al.*, 2015). Стоит отметить, что эффективность конверсии с использованием *M. ramannianus* составляла более 99% в течение сут.



Рисунок 17 – Структурные формулы соединений **59, 60**

Грибные биокатализаторы широко используются в биотехнологии как «зелёные» катализаторы, но при этом имеют ряд технологических, экономических и эксплуатационных ограничений. В частности, их применение ограничено медленным ростом, вариабельной ферментативной активностью, склонностью

к побочным метаболитам и сложностями масштабирования, что требует модификации штаммов и оптимизации биореакторных режимов.

1.5. Биологическая трансформация монотерпеноидов с использованием личинок насекомых

Помимо грибных и бактериальных катализаторов в трансформации монотерпеноидов используются личинки насекомых. Для этого исходные субстраты смешивают с кормом, а производные монотерпеноидов экстрагируют из фекальных масс. Так, личинки совки (*Spodoptera litura*) способны проводить окисление ментона и карвона (Marumoto *et al.*, 2017, 2018). При этом производными (–)-(1*R*,4*S*)-ментона (**61**) являются (–)-(1*R*,4*S*)-7-гидроксиментон (**62**), (+)-(1*R*,3*S*,4*S*)-7-гидроксинеоментон (**63**) и (–)-(1*R*,4*S*,8*S*)-*n*-мент-3-он-9-овая кислота (**64**). В результате трансформации (+)-(1*R*,4*S*)-ментона (**65**) образуются соответствующие энантиомеры: (+)-(1*R*,4*S*)-7-гидроксиментон (**66**), (–)-(1*R*,3*S*,4*S*)-7-гидроксинеоментон (**67**) и (+)-(1*R*,4*S*,8*S*)-*n*-мент-3-он-9-овая кислота (**68**) (Рисунок 18).

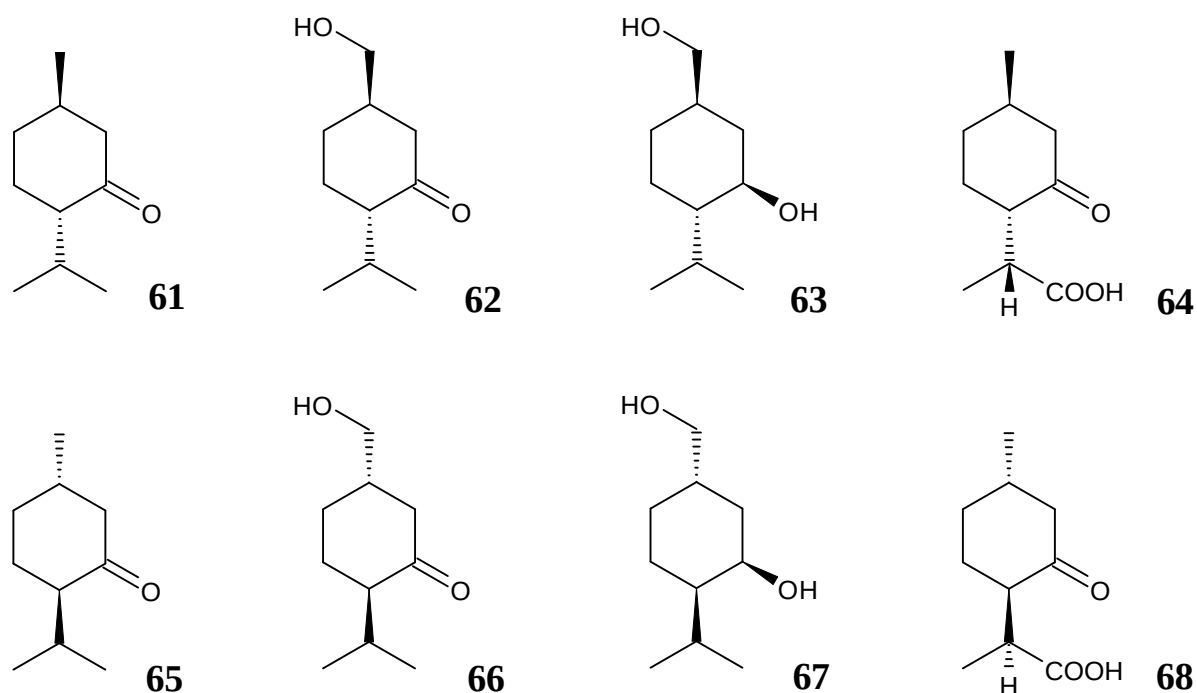


Рисунок 18 – Структурные формулы соединений **61–68**

Биологическая трансформация (+)-карвона (**6**) личинками *S. litura* приводит к образованию (+)-(4*S*)-10-гидроксикарвона (**69**), (+)-(4*S*)-7-гидроксикарвона (**70**) и (–)-(4*S*)-8,9-дигидрокси-8,9-дигидрокарвона (**71**) (рисунок 19).

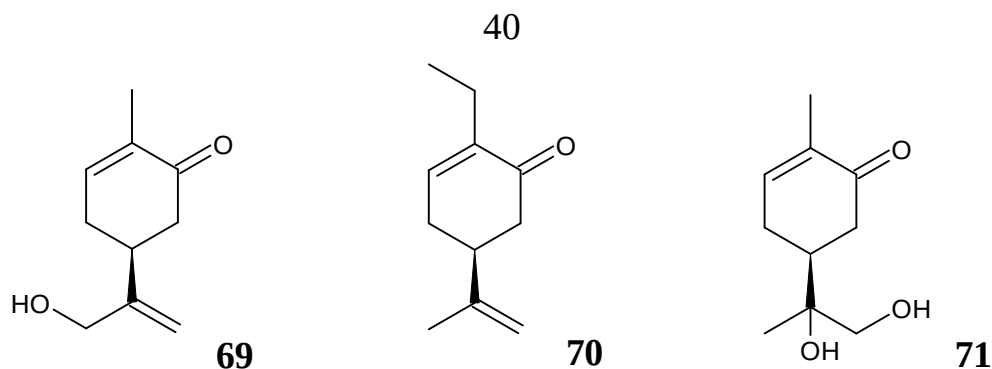


Рисунок 19 – Структурные формулы соединений **69–71**

Продуктами окисления (–)-карвона (**6**) являются четыре метаболита: (–)-(4*R*)-10-гидроксикарвон (**72**), (–)-(4*R*)-7-гидроксикарвон (**73**), (+)-(4*R*)-8,9-дигидрокси-8,9-дигидрокарвон (**74**) и (–)-(2*R*,4*R*)-10-гидроксикарвеол (**75**) (Рисунок 20).

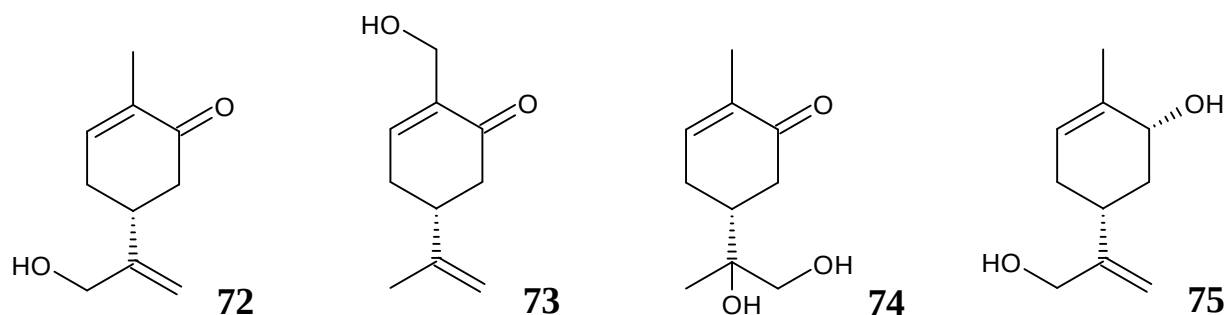


Рисунок 20 – Структурные формулы соединений **72–75**

Важно отметить, что совка *S. litura* является карантинным видом, полифагом и опасным вредителем широкого спектра культурных растений. Личинки совки паразитируют на листьях таких экономически значимых сельскохозяйственных растений как табак, хлопок, соя, свекла, капуста и нут, проявляя при этом высокую резистентность к используемым инсектицидам. Как следствие, использование данного организма в качестве продуцента биоактивных соединений является, хоть и интересным с фундаментальной точки зрения, но потенциально опасным, особенно в перспективе масштабирования биотехнологического процесса.

1.6. Актиномицеты как перспективный объект для биотрансформации гидрофобных органических соединений

Филум Actinomycetota – одна из крупнейших ветвей грамположительных прокариот, представленная шестью валидными классами: Acidimicrobiia, Actinomycetes, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria и Thermoleophilia (<https://lpsn.dsmz.de/phylum/actinomycetota>). Среди их отличительных генетических особенностей стоит отметить большой размер генома (нередко свыше 5 млн пар оснований) и значительное преобладание гуанин-цитозиновых пар. Морфологические характеристики актиномицетов также разнообразны: простые кокки и палочковидные клетки, формы с фрагментированным и высокоорганизованным ветвящимся мицелием. Жизненные стратегии этих организмов столь же вариативны: среди них встречаются строгие аэробы и анаэробы, спорулирующие и неспорулирующие виды. Представители филума освоили практически все природные ниши – от почв и пресных водоёмов до морских глубин, выступая в роли свободноживущих организмов, комменсалов или облигатных симбионтов животных и растений (Lewin *et al.*, 2016). Чрезвычайно велика роль актиномицетов в глобальных биогеохимических потоках, в первую очередь в углеродном цикле, благодаря способности к деструкции таких устойчивых биополимеров как целлюлоза и хитин (Anteneh, Franco, 2019).

С точки зрения биотехнологии, класс Actinomycetes выделяется уникальной метаболической оснащённостью. Их «ферментативный арсенал» включает высокоактивные амилазы, целлюлазы, протеазы, хитиназы, ксиланазы, пероксидазы, нитрилгидратазы и пектиназы (Mukhtar *et al.*, 2017), находящие применение в промышленности, сельском хозяйстве и экологической биотехнологии. Широко известна способность актиномицетов к трансформации нитрилов и ароматических ксенобиотиков, а также к синтезу компонентов биотоплива (Anteneh, Franco, 2019). В частности, представители вида *Corynebacterium glutamicum* производят этиленгликоль из глюкозы за счёт перенаправления серинового биосинтетического пути (Chen *et al.*, 2016). Этот же

микроорганизм активно используется для производства целого ряда ценных соединений: изобутанола (Blombach *et al.*, 2011), янтарной кислоты (Litsanov *et al.*, 2012), кадаверина (Buschke *et al.*, 2011) и L-аминокислот (Bommareddy *et al.*, 2014). Другой пример – дерацемизация ибупрофена с использованием бактерии *Nocardia corallina*, которая позволяет получать энантиомерно чистый фармакологически активный продукт (Lievano *et al.*, 2012).

Особого внимания заслуживают оксигеназные системы актиномицетов, ответственные за регио- и стереоселективное введение гидроксильных групп в молекулы сложных органических соединений. Показано, что цитохром P450-зависимые монооксигеназы *Streptomyces avermitilis* осуществляют направленное гидроксилирование фитоэстрогенов даидзеина и генистеина, в результате чего образуются производные с усиленными антиоксидантными, антимикробными и антибактериальными свойствами (Roh *et al.*, 2009).

Надёжной основой для поиска и разработки подобных биокаталитических технологий служат специализированные коллекции микроорганизмов, депонирующие штаммы с известными свойствами. Так, в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, <http://www.iegmscol.ru>) депонировано свыше 2500 чистых идентифицированных непатогенных культур актиномицетов, значительная часть которых является экстремотолерантными формами, обладает оксигеназной активностью и перспективна в качестве биодеструкторов или продуцентов биологически активных веществ (Ившина, 2012). Принципиально важными свойствами этих штаммов выступают отсутствие разветвлённого мицелия, широкая политрофность, метаболическая пластичность и продукция биосурфактантов, что в совокупности обеспечивает исключительно высокую трансформирующую активность в отношении самых разных гидрофобных субстратов (Larkin *et al.*, 2006; Kuyukina, Ivshina, 2010).

На базе коллекции детально исследован ряд штаммов, осуществляющих практически значимые биотрансформации. К примеру, *Rhodococcus rhodochrous*

ИЭГМ 66 селективно окисляет пентациклический тритерпеноид лупанового ряда бетулин до бетулоне – важного фармакологического предшественника (Grishko *et al.*, 2013; Tarasova *et al.*, 2017). Этот же штамм, а также штамм *Gordonia terrae* ИЭГМ 136, применяются для энантиоселективного синтеза оптически активных сульфоксидов, востребованных в тонком органическом синтезе и в медицине (Elkin *et al.*, 2013). Нерастущие клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 проявляли высокую каталитическую активность в отношении олеаноловой и глицерретоной кислот с образованием соответствующих 3-оксо производных (Luchnikova *et al.*, 2023). Более сложные превращения олеаноловой кислоты достигнуты с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 757 (Luchnikova *et al.*, 2022). В результате полной конверсии исходного субстрата был получен новый биоактивный метаболит – 3 β ,5 α ,22 α -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовая кислота.

Следует отметить, что интерес научного сообщества к актиномицетам, особенно к представителям рода *Rhodococcus* как эффективным биотрансформаторам, в последние годы заметно усилился, о чём свидетельствует резкое увеличение числа публикаций по данной теме (Рисунок 21).

Приведённые примеры демонстрируют, что актиномицеты, особенно коллекционные штаммы, обладающие немицелиальным ростом и высокой каталитической лабильностью, являются мощным инструментом современной биотехнологии.

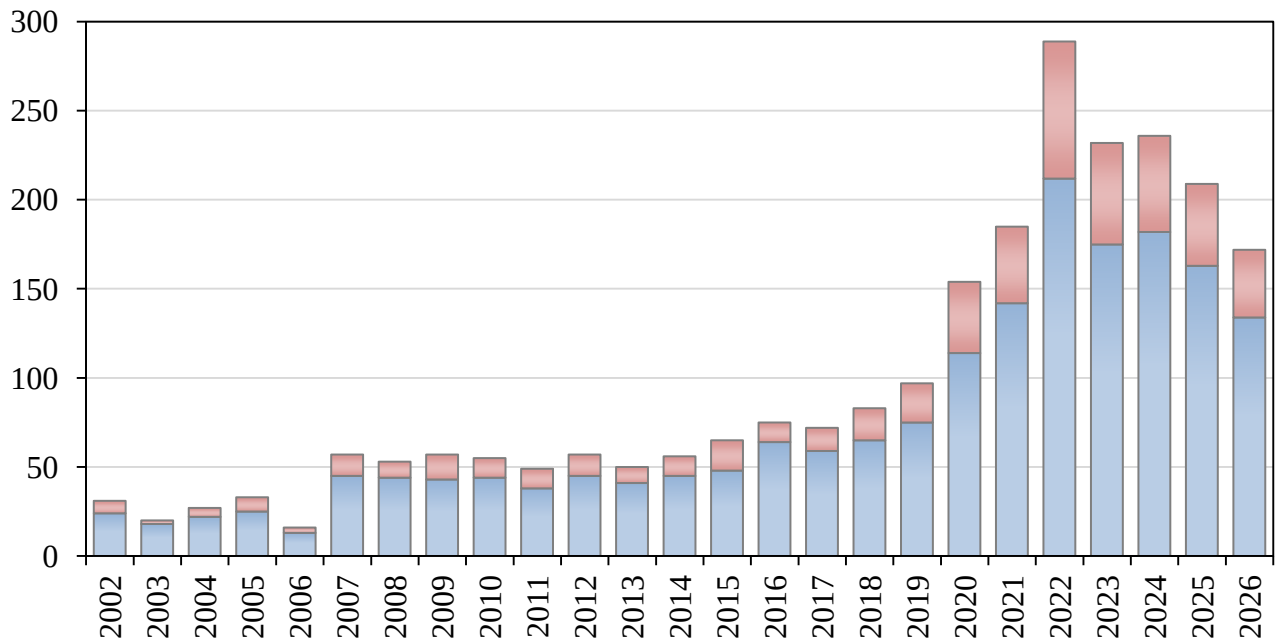


Рисунок 21 – Количество опубликованных научных работ, посвященных теме биотрансформации с использованием актиномицетов (■), в частности, представителей рода *Rhodococcus* (■) (по данным <https://www.sciencedirect.com/>). Поисковые запросы включали слова biotransformation, actinomycetes, *Rhodococcus*

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Рабочая коллекция

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.iegmc.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) (Таблица 3).

2.2. Условия культивирования

Для проведения скрининга бактериальные культуры выращивали в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, содержащих 20 мл минеральной среды 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). Для препаративного получения продуктов биотрансформации родококки выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды, в аналогичных описанным выше условиях. 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.

Таблица 3 – Коллекционные штаммы *Rhodococcus* spp., использованные в работе

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>Rhodococcus erythropolis</i>				
1	ИЭГМ 199	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ –C ₁₇), деградирует парацетамол, устойчив к Pb ²⁺ (20,0 мМ), Cr ⁶⁺ (10,0 мМ), Cu ²⁺ , Zn ²⁺ (5,0 мМ).	Вода, родник, Ольховское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия.
2	ИЭГМ 201	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₂ –C ₁₇), деградирует парацетамол, устойчив к Cr ⁶⁺ , Pb ²⁺ (5,0 мМ), VO ²⁺ (12,5 мМ), VO ₄ ³⁻ (50,0 мМ), VO ₃ ⁻ (>250,0 мМ).	Вода, родник, Ольховское нефтеперерабатывающее предприятие	Пермский край, Россия.
3	ИЭГМ 344	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, устойчив к Mo ⁶⁺ , Pb ²⁺ (5,0 мМ).	Муниципальные воды	Харбин, Китай
<i>R. fascians</i>				
4	ИЭГМ 525	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Pb ²⁺ , Mo ⁶⁺ , Cr ⁶⁺ , Ni ²⁺ .	Почва, НГДУ «Краснокамскнефть»	Ножовка, Пермский край, Россия
5	ИЭГМ 1218	Использует жидкие <i>n</i> -алканы (C ₁₁ –C ₁₆), бутанол, ксилол, сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr ⁶⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺ (10,0 мМ), Mo ⁶⁺ , Zn ²⁺ (10,0 мМ), Cd ²⁺ , Cu ²⁺ (5,0 мМ).	Ризосфера, Строгановский отвал	Свердловская область, Россия
<i>R. jostii</i>				
6	ИЭГМ 60	Использует пропан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C ₁₀ –C ₁₆), трансформирует тиоанизол, устойчив к Mo ⁶⁺ (5,0 мМ).	Нефтезагрязненная почва, месторождение нефти	Украина
<i>R. opacus</i>				
7	ИЭГМ 488	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода.	Нефтезагрязненная вода, река Уньва	Пермский край, Россия
<i>R. pyridinivorans</i>				
8	ИЭГМ 1055 ¹	Деградирует пиридин, устойчив к Pb ²⁺ (20,0 мМ), Cr ⁶⁺ (10,0 мМ), Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ (5,0 мМ).	Промышленные сточные воды	Северная Корея
9	ИЭГМ 1142	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr ⁶⁺ (40,0 мМ), Zn ²⁺ (20,0 мМ), Cd ²⁺ , Mo ⁶⁺ (5,0 мМ).	Ризосфера	Свердловская область, Россия
10	ИЭГМ 1227	Использует пропан, <i>n</i> -гексадекан, бутанол, ксилол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr ⁶⁺ , Zn ²⁺ (20,0 мМ), Cu ²⁺ , Mo ⁶⁺ , Ni ²⁺ (5,0 мМ).	Вода, Лысьвенский пруд	Лысьва, Пермский край, Россия

Продолжение Таблицы 3

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
<i>R. qingshengii</i>				
11	ИЭГМ 247	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, деградирует эфиры фталевой кислоты, устойчив к Zn^{2+} (20,0 мМ), Mo^{6+} (10,0 мМ), Cr^{6+} , Pb^{2+} (5,0 мМ).	Почва, производство лавсана (полиэфирный материал)	Могилёв, Беларусь
12	ИЭГМ 267	Использует <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, трансформирует дитерпеноиды (дегидроабетиновая кислота), продуцирует холестерол оксидазы, устойчив к Cr^{6+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (250,0 мМ).	Нефтезагрязненная почва, нефтедобывающее предприятие	Пермский край, Россия
13	ИЭГМ 1016 [†]	Деградирует карбендазим, устойчив к Pb^{2+} (20,0 мМ), Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (5,0 мМ).	Почва, загрязненная карбендазимом	Провинция Цзянсу, Китай
<i>R. rhodochrous</i>				
14	ИЭГМ 63	Трансформирует тиоанизол, аккумулирует ионы цезия, адгезируется к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr^{6+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ).	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
15	ИЭГМ 64	Трансформирует тиоанизол, аккумулирует молибден и никель, продуцирует холестерол оксидазу, адгезирует к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr^{6+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ).	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
16	ИЭГМ 66	Использует углеводороды, трансформирует тиоанизол, бетулин и дегидроабетиновую кислоту, катализирует окисление прохиральных сульфидов в (S)-сульфоксиды, адгезируется к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, этанолу, Cr^{6+} (10,0 мМ), Mo^{6+} (5,0 мМ).	Городская почва	Эдинбург, Великобритания
17	ИЭГМ 67	Использует пропан в качестве единственного источника углерода, окисляет ряд короткоцепочечных первичных и вторичных спиртов (C2-C8) и типичных циклических и ароматических спиртов, производит эпоксиды из этена, пропена и бут-1-ена, но не из бут-2-ена, пент-1-ена или фенилпропена, трансформирует тиоанизол, адгезирует к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, этанолу, Mo^{6+} (5,0 мМ).	Почва	Великобритания
18	ИЭГМ 107	Использует <i>n</i> -гексадекан как единственный источник углерода, деградирует дегидроабетиновую кислоту, устойчив к Pb^{2+} (10,0 мМ), Cr^{6+} , Cu^{2+} (5,0 мМ).	Вода, река Днепр	Днепропетровская область, Украина
19	ИЭГМ 608	Использует <i>n</i> -гексадекан как единственный источник углерода, деградирует дротаверина хлорид, адгезирует к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к Cr^{6+} (40,0 мМ), Mo^{6+} , Zn^{2+} (5,0 мМ).	Вода	Березники, Россия

Продолжение Таблицы 3

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
20– 23	ИЭГМ 609, ИЭГМ 629, ИЭГМ 632, ИЭГМ 646	Используют углеводороды в качестве единственного источника углерода, трансформируют тиоанизол, устойчивы к Cr^{6+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mo^{6+} , Pb^{2+} .	Вода	Березники, Россия
24	ИЭГМ 639	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, жидкие <i>n</i> -алканы (C_{11} – C_{16}) и алифатические спирты (этанол, <i>n</i> -пропанол, <i>n</i> -бутанол) в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, адгезирует к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), устойчив к <i>n</i> -гексану, Cr^{6+} (40,0 мМ), Zn^{2+} (20,0 мМ), Mo^{6+} (10,0 мМ), Cd^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ)	Снег, месторождение нефти	Пермский край, Россия
25	ИЭГМ 647	Продуцирует холестерол оксидазы, трансформирует тиоанизол, деградирует мелоксикам, адгезируется к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), аккумулирует молибден и никель, устойчив к дротаверину гидрохлориду, <i>n</i> -декану, 1-бутанолу, этанолу, Cr^{6+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (50,0 мМ), VO^{3-} (250,0 мМ).	Нефтезагрязненная вода, Межевское месторождение нефти	Пермский край, Россия
26	ИЭГМ 653	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, аккумулирует ионы цезия, устойчив к Cr^{6+} (40,0 мМ), Mo^{6+} (10,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ).	Неизвестно	Неизвестно
27	ИЭГМ 654	Продуцирует нитрилазы, гидрогенирует нитроолефины (1-фенил-2-нитропропен до 1-фенил-2-нитропропана), трансформирует тиоанизол, устойчив к Mo^{6+} (5,0 мМ).	Почва	Неизвестно
28	ИЭГМ 655	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и жидкие <i>n</i> -алканы (C_{11} – C_{16}) в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, трансформирует тиоанизол, устойчив к Zn^{2+} (20,0 мМ), Cr^{6+} , Mo^{6+} (5,0 мМ).	Почва, обогащенная пропаном и минеральными солями	Неизвестно
29	ИЭГМ 757	Использует <i>n</i> -гексадекан, бутанол и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Zn^{2+} (10,0 мМ), Mo^{6+} (5,0 мМ).	Нефтезагрязненная почва	Пермский край, Россия
30	ИЭГМ 760	Использует углеводороды в качестве единственного источника углерода, окисляет алкилбензолы, устойчив к Zn^{2+} (10,0 мМ), Mo^{6+} (5,0 мМ).	Почва	Неизвестно
31	ИЭГМ 1138	Использует пропан, <i>n</i> -бутан, <i>n</i> -гексадекан и сырую нефть в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr^{6+} , Mo^{6+} , Zn^{2+} (5,0 мМ).	Нефтезагрязненная почва	Соликамск, Пермский край, Россия
32 33	ИЭГМ 1161, ИЭГМ 1162	Используют <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчивы к Cr^{6+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{6+} , Cd^{2+} .	Ризосфера <i>Atriplex</i> , бывшая свалка	Пермь, Россия

Продолжение Таблицы 3

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
34	ИЭГМ 1360	Использует бутанол и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к Cr^{6+} (40,0 мМ), Mo^{6+} (10,0 мМ), Zn^{2+} (5,0 мМ).	Ризосфера мха, почва рядом с ручьем, бухта Тихая	о. Гукера, Земля Франца Иосифа, Россия
35	ИЭГМ 1362	Использует <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, деградирует дегидроабетиновую кислоту, устойчив к Cr^{6+} (40,0 мМ), Mo^{6+} , Zn^{2+} (5,0 мМ).	Торф, Пальтинское месторождение торфа	Пермский край, Россия
<i>R. ruber</i>				
36	ИЭГМ 70 ¹	Использует ароматические углеводороды и их производные (бензоат, гентизат, 3-гидроксibenзоат, 4-гидроксibenзоат, фенол, протокатехуат) в качестве единственного источника углерода, деградирует 4-метоксibenзоат, ванилит и фталат, устойчив к Pb^{2+} (5,0 мМ).	Песчаник ордовикского возраста	Иркутская обл., Россия
37	ИЭГМ 71	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексан в качестве единственного источника углерода, деградирует диметилфталат, диметилтерефталат и ди-(2-этилгексил)фталат, устойчив к линкомицину, метициллину, полимиксину, сефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, устойчив к Pb^{2+} (10,0 мМ).	Вода, поверхностный водоем	п-ов. Таймыр, Россия
38	ИЭГМ 72	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C_{12} - C_{17}), продуцирует холестерол оксидазу, трансформирует β -ситостерол, устойчив к Pb^{2+} (5,0 мМ).	Образец керна с глубины 110 м	Беларусь
39	ИЭГМ 73	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, трансформирует тиоанизол, адгезирует к жидким углеводородам (<i>n</i> -гексадекан), продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -гексадекане, устойчив к Cr^{6+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} (5,0 мМ), VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ).	Грунтовые воды, контурная зона Масунинского месторождения	Пермский край, Россия
40	ИЭГМ 74	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -алканах (C_{12} - C_{17}), устойчив к Cr^{6+} , Pb^{2+} (5,0 мМ).	Песчаный грунт ордовикского периода	Иркутская область, Россия
41	ИЭГМ 76	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, деградирует дибутилфталат и ди(2-этилгексил)фталат, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, трансформирует тиоанизол, устойчив к Pb^{2+} (10,0 мМ), Cu^{2+} (5,0 мМ).	Снег, контурная зона месторождения	Пермский край, Россия

Окончание Таблицы 3

№ п/п	Номер в коллекции ИЭГМ	Характеристика	Источник выделения	География выделения
42	ИЭГМ 77	Использует пропан, <i>n</i> -бутан и <i>n</i> -гексадекан в качестве единственного источника углерода, деградирует дибутилфталат, устойчив к линкомицину, метициллину, оксациллину, полимиксину, цефалексину и налидиксовой кислоте при росте на пропане и <i>n</i> -гексадекане, растет на среде в присутствии 10 мМ кадмия, трансформирует тиоанизол, деградирует парацетамол и мелоксикам, устойчив к VO^{2+} (12,5 мМ), VO_4^{3-} (100,0 мМ), VO^{3-} (>250,0 мМ), продуцирует биосурфактанты при росте на <i>n</i> -гексадекане, аккумулирует никель.	Вода, родник, контурная зона месторождения	Пермский край, Россия
43 44	ИЭГМ 79, ИЭГМ 81	Используют пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, деградируют дибутилфталат и сложные эфиры <i>o</i> -фталевой кислоты, растут на среде с 10 мМ кадмия, аккумулируют ионы цезия, устойчивы к Pb^{2+} (5,0 мМ).	Песчаная почва	Гомельская область, Беларусь
45	ИЭГМ 80	Использует пропан и <i>n</i> -бутан в качестве единственного источника углерода, продуцирует холестерол оксидазу, устойчив к Pb^{2+} (5,0 мМ).	Песчаная почва	Гомельская область, Беларусь

2.3. Химические реагенты

Химические реагенты, в том числе этилацетат, гексан, этанол, имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или о.с.ч. (Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

2.4. Микроскопические исследования

2.4.1. Фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия

Визуализацию бактериальных клеток и измерение их размеров осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (Zeiss, Германия), оснащенного фотокамерой Axioscam 506 Color и флуоресцентным источником света НХР 120 V (Zeiss, Германия), в режиме фазового контраста или флуоресценции (FS 106) с увеличением $\times 1000$. Для детекции экзополисахаридов использовали флуорохромный краситель Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, Германия). Объём (V) и площадь клеток (S) рассчитывали по формулам 1 и 2 (Neumann *et al.*, 2005):

$$V = r^2 \pi h \text{ (мкм}^3\text{);} \quad (1)$$

$$S = 2r^2 \pi + \pi r h \text{ (мкм}^2\text{),} \quad (2)$$

где r – $\frac{1}{2}$ ширины клетки,

π – 3,14,

h – длина клетки.

2.4.2. Атомно-силовая (АСМ) и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Исследование морфологии бактериальных клеток проводили с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 26 1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0,5–4,4 N/m. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus

Corporation, Япония). Для получения совмещенных АСМ-КЛСМ изображений КЛСМ-изображение импортировали в программное обеспечение АСМ Igor Pro 6/22A (Wave Metrics, США).

2.4.3. Сканирующая (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Культуры, выращенные в течение 72 сут на твердой среде, фиксировали в 2,5% глутаральдегиде (вес/об.) в 0,1 М буфере какодилата натрия (рН 7,2) в течение 2,5 часов и затем постфиксировали в 1% (вес/об.) четырехоксида осмия в том же буфере. Зафиксированный материал обезвоживали серией растворов этанола, в том числе абсолютным этанолом, насыщенным ацетатом уранила и заливали в аралдит. Тонкие срезы готовили на ультратоме 8800 Ultratome III (LKB-Produkter, Швеция) и окрашивали цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония). Целые клетки просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (Jeol, Япония).

2.5. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия с картированием элементов

Приготовленные в дистиллированной воде (без фиксатора) суспензии бактериальных клеток наносили на медные сетки, покрытые формваром и армированные углеродом, и сушили на воздухе. ПЭМ с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (ЭДС) и картированием элементов выполняли с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенного системой энергодисперсионного рентгеновского анализа (Inca Energy-350, Oxford Instruments, Великобритания), работающей при ускоряющем напряжении 80 кэВ (угол наклона 15°). ЭДС-спектры и элементные карты получали с использованием программного обеспечения AZtec (Oxford Instruments, Великобритания).

2.6. 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). Адсорбционную ёмкость твердых носителей вычисляли по формуле 3.

$$S = (S_{\text{исх}} - S_{\text{равн}}) \times 100\% / S_{\text{исх}}, \quad (3)$$

где S – степень адсорбции, %;

$S_{\text{исх}}$ – оптическая плотность суспензии до иммобилизации, ОП₆₀₀;

$S_{\text{равн}}$ – оптическая плотность суспензии после иммобилизации, ОП₆₀₀.

Для иммобилизации бактериальные клетки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 48 ч, затем осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Hermle Z 200 А, Германия) и промывали фосфатно-щелочным буфером (рН 7,0). Отмытые клетки ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного (рН 7,0) буфера и доводили оптическую плотность суспензии до ОП₆₀₀ 1,0. В полученную суспензию вносили 10 фрагментов ткани ($S_{\text{фрагмента}} = 1 \text{ см}^2$) или 200 полипропиленовых дисков ($d_{\text{диска}} = 0,5 \text{ см}$) на 100 мл суспензии из расчета 3×10^7 кл/мл. Процесс иммобилизации проводили при перемешивании 130 об/мин и температуре 28°C в течение 3 сут, незакрепленные клетки отмывали фосфатно-щелочным буфером. Изменение оптической плотности (ОП₆₀₀) суспензий регистрировали с использованием спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin Elmer, США).

Закрепление актиномицетов в матрицу поливинилового спирта (ПВС) осуществляли согласно методике (Kuyukina *et al.*, 2005). Для этого клетки предварительно выращивали в течение 72 ч при 28°C в МПБ. 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 °C в течение 12 ч, а затем оттаивали при 4 °C в течение 5 ч. Проводили

три цикла замораживания-оттаивания. Хранение полученного биокатализатора осуществляли при 4 °С. 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 (pH 7,0).

2.7. Локализация ферментных систем

Для определения локализации ферментов, участвующих в процессе биотрансформации (–)-изопулегола, предварительно выращенные в течение 2 сут в МПБ клетки трижды отмывали, ресуспендировали в фосфатно-щелочном буфере (pH 7,0) и гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (MSE, Великобритания, амплитуда 10 мкм, 45 мин). Клеточный гомогенат центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин) для получения цитоплазматических ферментов (I). Солюбилизацию мембранно-связанных ферментов проводили путём ресуспендирования осадка в 100 мл 1%-го раствора Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-щелочном буфере (pH 7,0) и перемешивания полученной суспензии на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Смесь центрифугировали и получали супернатант с экстрагируемыми мембранно-связанными ферментами (II). Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной (III), ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного буфера (pH 7,0).

2.8. Жизнеспособность бактериальных клеток

Для определения жизнеспособности бактериальных клеток использовали метод окрашивания йодонитротетразолием хлоридом (INT) (Kuyukina *et al.*, 2005). Для этого 100 мкл культуральной жидкости окрашивали в 96-луночном полистероловом планшете путем внесения в лунку 50 мкл 0,2% водного раствора INT (Sigma-Aldrich, США). В результате восстановления красителя с образованием нерастворимого в воде формазана наблюдали красно-фиолетовое окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в образце активно

респираторных бактериальных клеток. Для полного восстановления красителя образцы инкубировали при температуре 28 °C в течение 2 ч. Оптическую плотность формазана (ОП₆₃₀) измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v. 2.6. (Thermo Labsystems, Финляндия) при длине волны 630 нм.

Для детекции живых и мертвых бактериальных клеток суспензию окрашивали двухкомпонентным флуоресцентным красителем Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits (Invitrogen, США). Для этого каплю (10 мкл) клеточной суспензии помещали на предметное стекло, смешивали с эквивалентным объемом красителя и оставляли в темноте на 10–15 мин. Затем окрашенный образец накрывали покровным стеклом и микроскопировали в иммерсионной системе в режиме флуоресценции на микроскопе Axio Imager M2 (Zeiss, Германия).

2.9. Электрокинетический потенциал

Бактериальные клетки, предварительно выращенные в присутствии или без (–)-изопулегола, отмывали и ресуспендировали в 10 мМ KNO₃ до ОП₆₀₀ 0,2 (спектрофотометр Lambda EZ201, Perkin-Elmer, США). Измерение электрокинетического (дзета, ζ) потенциала проводили с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Заряд бактериальных клеток определяли методом электрофоретического рассеяния света. Образец объемом 0,7 мл помещали в кювету с электродом погружного типа, на который подавали электрическое поле напряжением 4 мВ, что приводило к перемещению молекул, обладающих результирующим электрокинетическим потенциалом, к противоположно заряженному электроду со скоростью, пропорциональной напряжённости поля и заряду клеток.

2.10. Внутриклеточные липидные включения

Для детекции внутриклеточных липидных включений бактериальные клетки окрашивали 0,08% раствором красителя нильский красный (Nanjing Dulai

Biotechnology Co., Китай) в ДМСО (Mrunalini and Girisha, 2017). Для этого суспензию клеток (1 мл) центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия). Осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли 40 мкл рабочего раствора нильского красного (конечная концентрация 0,3 мкг/мл). Полученную суспензию инкубировали при 28 °С в течение 40 мин при постоянном перемешивании (160 об/мин). Клетки отделяли от реакционной среды центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Окрашенную клеточную суспензию (20 мкл) наносили на чистое предметное стекло и регистрировали флуоресценцию при использовании узкополосного светофильтра 450–500 нм на микроскопе Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия).

2.11. Респираторная активность

Респираторную активность определяли с помощью 10-канального респирометра Columbus Micro-Oxymax (Columbus Instruments, США), оценивая скорость дыхания (мкл/ч), а также количество потребленного кислорода и выделенного углекислого газа (мкл) бактериальными клетками. Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Oxymax вместимостью 300 мл, с объемом минеральной среды 100 мл при постоянном перемешивании (300 об/мин, 28±2 °С) на магнитной мешалке IKAMAG® RO10 power (IKA Werke, Германия). Автоматическая регистрация респираторной активности проводилась каждые 21 мин в течение 5 сут.

2.12. Каталазная активность

Каталазную активность родококков определяли согласно методике (Gogoleva *et al.*, 2012). Бактериальные клетки центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, отмывали фосфатным буфером (рН 7,0) и ресуспендировали в том же буфере до ОП₄₉₂ 0,2. К 200 мкл клеточной суспензии вносили 1 мл 1,25 мМ раствора H₂O₂ и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем вносили 100 мкл 2н раствора HCl для остановки процесса каталазного расщепления пероксида водорода. К полученной смеси добавляли

1 мл 0,025 М раствора KI, аккуратно перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. В контрольных образцах вместо клеточной суспензии использовали дистиллированную воду. Оптическую плотность супернатанта измеряли с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 492 нм. Каталазную активность рассчитывали по формуле 4:

$$A_{\text{кат}} = \frac{12,5(1 - \frac{ОП_0}{ОП_к})}{T \times ОП_6}, \quad (4)$$

где $A_{\text{кат}}$ – каталазная активность, мкМ/мин $\times$ ОП;

$ОП_0$ – оптическая плотность супернатанта в опытном образце, ед. опт. плотн.;

$ОП_к$ – оптическая плотность супернатанта в контрольном образце, ед. опт. плотн.;

T – время инкубации бактерий в присутствии H_2O_2 (10 мин);

$ОП_6$ – оптическая плотность бактериальной суспензии ($ОП_{492}$ 0,2).

2.13. Полногеномное секвенирование

Геномная библиотека «случайных фрагментов» пригодная для секвенирования была подготовлена с помощью набора NEBNextultra II DNA Library kit (NEB) и прочитана на геномном анализаторе MiSeq (Illumina, США). Секвенирование проводили на базе Федерального исследовательского центра Биотехнологии Российской академии наук. Полный геном штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 доступен в базе данных NCBI под номером NZ_JANFQM000000000.1.

2.14. Биоинформатический анализ

Идентификацию структурных (белок-кодирующих) генов, генов рибосомных РНК и теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, <https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz *et al.*, 2008). Биоинформатический анализ аннотированных последовательностей, полученных в результате полногеномного секвенирования, включал поиск генов, кодирующих ферменты, предположительно катализирующие реакции превращения (–)-изопулегола.

Сравнение последовательностей целевых генов выполняли с помощью сервисов 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).

2.15. Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения нуклеиновых кислот клетки разрушали путем инкубирования отмытой биомассы в растворе лизоцима в деионизированной воде в концентрации 40 мг/мл. Дальнейшее выделение ДНК и РНК проводили согласно Протоколам наборов для выделения геномной ДНК ExtractDNA Blood&Cell (Евроген, Россия) и РНК RNASolo (Евроген, Россия) соответственно. Концентрацию и чистоту выделенных нуклеиновых кислот оценивали с помощью флуориметра QubitTM (Thermo Fisher Scientific, США) и спектрофотометра NanoPhotometer N50 (Implen, США) соответственно.

2.16. ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР в реальном времени

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. Состав реакционной смеси, мкл: РНК-матрица – 6, случайный декануклеотидный праймер – 3, 5x буфер для синтеза первой цепи – 4, смесь дНТФ – 2, дитиотреитол – 2, ревертаза – 3, деионизированная и свободная от РНКаз вода (Евроген, Россия).

Условия ОТ-ПЦР:

этап 1 – 40 °C, 60 мин,

этап 2 – 70 °C, 10 мин.

Полученные ДНК и кДНК использовали для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с готовой смесью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) и праймерами, подобранными в результате биоинформатического анализа, на амплификаторе Real-time CFX Connect (Bio-Rad, США). Положительным контролем служили

видо-специфические праймеры на основе гена 16S рРНК к *Rhodococcus rhodochrous*. Протокол ПЦР включал следующие стадии и условия:

Стадия 1	95,0 °С; 3 мин	
Стадия 2	95,0 °С; 30 сек	} 40 циклов
Стадия 3	Градиент 55,0–65,0 °С; 30 сек	
Стадия 4	72,0 °С; 1:30 мин	
Стадия 5	Кривая плавления от 65,0 до 95,0 °С, шаг 0,5 °С; 5 сек	
Стадия 6	72,0 °С; 10 мин	

2.17. Детекция нуклеиновых кислот

Присутствие и размеры продуктов амплификации в реакционной смеси после ПЦР определяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с использованием системы гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Электрофоретическое разделение проводили при напряжении 70 В в течение 40 мин. В качестве красителя нуклеиновых кислот использовали GelRed (Диаэм, Москва). Продукты ПЦР (5 мкл) вносили в агарозный гель в буфере для внесения 4X Gel Loading Dye, Blue (0,5 мкл) (Евроген, Россия).

Условия электрофореза:

1. Для РНК – 1,2 % агароза (Sigma, США), ТАЕ-буфер, образцы РНК и маркеры молекулярного веса РНК 50–1000 п.н. (New England Biolabs, США) смешивали с буфером для внесения образцов, нагревали при 70°С в течение 2 мин, помещали на лёд на 1 мин и затем вносили в гель.

2. Для кДНК – 1 % агароза, ТВЕ-буфер, маркеры молекулярного веса ДНК от 250 до 3000 п.н. (Диаэм, Россия).

3. Для ДНК-ампликонов – 1,5 % агароза, ТВЕ-буфер, маркеры молекулярного веса ДНК от 700 до 50 п.н. (Евроген, Россия).

Состав буфера ТАЕ 50х, г/мл: Tris-base – 97, EDTA – 7,5, уксусная кислота – 37, рН 7,6. Состав буфера ТВЕ 10х, г/мл: Tris-base – 107,8, Boric acid – 55,03, EDTA – 43,84, дистиллированная вода – 863,3, рН 8,3. Для приготовления буферов использовали соли со степенью чистоты ≥ 95 % производства Sigma-

Aldrich (США). рН доводили до нужных значений с помощью внесения уксусной кислоты (0,1 М).

2.18. Определение относительного уровня экспрессии генов

Праймеры к целевым и референсным генам были разработаны с использованием сервиса Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Эффективность амплификации (E, %) для каждой пары праймеров и коэффициент корреляции (R^2) рассчитывали методом калибровочной кривой, используя серию десятикратных разведений ДНК. Эффективность амплификации рассчитывали по формуле 5:

$$E = \left(10^{\left(-\frac{1}{\text{slope}} \right)} - 1 \right) \times 100, \quad (5)$$

где slope – угол наклона калибровочной кривой.

В идеальных условиях при каждом цикле амплификации происходит увеличение ПЦР продукта ровно в 2 раза, что соответствует значению эффективности 100%. Коэффициент корреляции R^2 , в свою очередь, определяет верность модели линейной зависимости значений порогового цикла (C_t) от логарифма концентрации калибровочных образцов и должен составлять не менее 0,98.

Стабильность референсных генов оценивали с помощью онлайн-сервиса RefFinder (<https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/>), включающего четыре алгоритма: geNorm, NormFinder, BestKeeper, метод Delta C_t , и их сравнительный анализ. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Нормализацию результатов кПЦР-РВ проводили с использованием отобранных в рамках настоящей работы референсных генов *gyrB* и *secA*. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом Пфаффа (Pfaffl, 2001), учитывающим эффективность амплификации по формуле 6:

$$\text{Уровень экспрессии} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t\text{target}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t\text{ref}}}}, \quad (6)$$

где E_{target} и E_{ref} – эффективность амплификации целевого и референсного гена, соответственно;

$\Delta C_{\text{t}_{\text{target}}}$ и $\Delta C_{\text{t}_{\text{ref}}}$ – разница между пороговыми циклами контрольного и опытного образца для целевого и референсного гена, соответственно.

Значения C_{t} , превышавшие 35, считали фоновыми и указывающими на отсутствие экспрессии.

2.19. Цифровая ПЦР

Праймеры и зонды для проведения цифровой ПЦР подбирали с использованием программы Gemi v.1.3.1 (Sobhy and Colson, 2012). Последовательности зондов были модифицированы флуорофором FAM на 5'-конце и гасителем BHQ-1 на 3'-конце.

Цифровую ПЦР проводили с использованием амплификатора RainSure SG-2000 (Suzhou PreciGenome Ltd, Co; Китай). Реакционная смесь включала: Digital PCR Mastermix – 10 мкл, праймеры – 0,9 мМ, зонд – 0,25 мМ, кДНК – 2 мкл, деионизированная вода – до 20 мкл. Протокол ПЦР включал следующие стадии и условия:

Стадия 1	95,0 °C; 10 мин	} 40 циклов
Стадия 2	94,0 °C; 30 сек	
Стадия 3	58 °C; 1 мин	
Стадия 4	98,0 °C; 10 мин	
Стадия 5	20 °C; 2 мин	

Детекцию результатов проводили с помощью сканера биочипов Dscanner4-1000 (Suzhou PreciGenome Ltd, Co; Китай) со встроенным программным обеспечением GeneCount v.1. Автоматизированная система анализа и обработки изображений биочипов считывала значение флуоресцентного сигнала капель и определяла абсолютное число копий на мкл образца с использованием распределения Пуассона.

2.20. Качественный и количественный анализ (–)-изопулегола и его метаболитов

Для экстракции остаточного (–)-изопулегола и его метаболитов ферментационную среду подкисляли 10% р-ром HCl и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1% водным р-ром 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 р-ром 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 полноэкранный режим (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 р-ров 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 (^{13}C) и ЯМР-спектрометра Bruker Avance-III 600 (Bruker BioSpin GmbH, Германия) при частоте 600,30 МГц (^1H) и 150,95 МГц (^{13}C). В качестве растворителя использовали CDCl_3 . Определяли химический сдвиг (δ) в ppm по отношению к остаточному CHCl_3 ($\delta(\text{H})$ 7,24, $\delta(\text{C})$ 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).

(1*R*,2*S*,5*R*)-5-(Гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол. Белый порошок, $T_{\text{плав}}$ 67,8 °C, $[\alpha]_{580}^{26} = -0.5$ ($c = 5$, CHCl_3). ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , ppm, $J/\text{Гц}$): 0,90–1,05 (m, 2H, 2- H_a , 6-H), 1,26–1,39 (m, 1H, 5- H_a), 1,55–1,68 (m, 1H, 1- H_a), 1,68–1,70 (m, 3H, 9- Me), 1,69–1,82 (m, 2H, 5- H_e , 6- H'), 1,86–1,95 (m, 1H, 4- H_a), 2,11 (dm, 1H, 2J 12,2, 2- H_e), 3,43–3,54 (m, 3H, 3- H_a , 10-H, 10- H'), 4,82–4,86 (m, 1H, 8-H), 4,87–4,91 (m, 1H, 8- H'). ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 39,1 (d, C-1), 36,8 (t, C-2), 70,1 (d, C-3), 54,3 (d, C-4), 29,0 (t, C-5), 28,5 (t, C-6), 146,2 (s, C-7), 113,0 (t, C-8), 19,1 (q, C-9), 67,8 (t, C-10). МС-ВР: m/z расщ. для $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 170,1301. Факт.: 170,1299.

(1*R*,3*R*,4*S*)-3-Гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильная кислота. Белый порошок, $T_{\text{плав}}$ 121,2–121,9 °C, $[\alpha]_{580}^{26} = -9.1$ ($c = 0,4$, CHCl_3). ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 1,28–1,51 (m, 3H, 2- H_a , 5- H_a , 6-H), 1,69 (br.s, 3H, 9- Me), 1,72–1,82 (m, 1H, 5- H_e), 1,90–1,97 (m, 1H, 4- H_a), 1,95–2,04 (m, 1H, 6- H'), 2,30–2,47 (m, 2H, 1- H_a , 2- H_e), 3,44–3,55 (m, 1H, 3- H_a), 4,84–4,87 (m, 1H, 8-H), 4,89–4,92 (m, 1H, 8- H'). ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 41,6 (d, C-1), 35,6 (t, C-2), 69,6 (d, C-3), 53,4 (d, C-4), 28,7 (t, C-5), 27,9 (t, C-6), 145,6 (s, C-7), 113,5 (t, C-8), 19,0 (q, C-9), 180,5 (s, C-10). МС-ВР: m/z расщ. для $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$: 184,1094. Факт.: 184,1096.

(2*R*,4*R*,4a*R*,7*R*,8a*R*)-2-(4-Гидрокси-3-метоксифенил)-7-(гидроксиметил)-4-метилоктагидро-2*H*-хромен-4-ол. Бесцветное масло. ^1H ЯМР (400.13 МГц, CDCl_3 ,

δ , ppm, $J/\text{Гц}$): 0.91-1.12 (м, 2H, H-7, H-8), 1.09-1.22 (м, 1H, H-10), 1.29 (с, 3H, Me-11), 1.29-1.38 (м, 1H, H-6), 1.54-1.65 (м, 1H, H-9), 1.72-1.81 (м, 1H, H-4), 1.81-1.93 (м, 2H, H-4', H-8'), 1.98-2.05 (м, 1H, H-7'), 2.05-2.12 (м, 1H, H-10'), 3.28 (td, $J = 10.5, 4.3$, 1H, H-1), 3.48 (дд, $J = 6.2, 1.0$, 2H, 2H-16), 3.87 (с, 3H, Me-19), 4.37 (дд, $J = 11.6, 2.1$, 1H, H-3), 5.59 (с, 1H, OH), 6.79 (дд, 1H, $J 8.0, 2.0$, H-18), 6.84 (д, 1H, $J = 8.0$, H-17), 6.87 (д, 1H, $J 2.0$, H-14). ^{13}C ЯМР (100.61 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 21.3 (к, C-11), 22.5 (т, C-7), 28.6 (т, C-8), 35.8 (т, C-10), 39.1 (д, C-9), 49.9 (т, C-4), 52.3 (д, C-6), 55.8 (к, C-19), 67.8 (т, C-12), 70.8 (с, C-5), 76.2 (д, C-3), 77.1 (д, C-1), 108.6 (д, C-18), 114.0 (д, C-17), 119.0 (д, C-14), 134.0 (с, C-13), 145.0 (с, C-16), 146.4 (с, C-15). Масс-спектр: m/z 322.1778; вычислено для $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5]^+$ 322.1775.

(2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-7-(Гидроксиметил)-4-метил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол. Белый порошок. ^1H ЯМР (400.13 МГц, CDCl_3 , δ , ppm, $J/\text{Гц}$): 0.79-1.06 (м, 3H, H-7, H-8, H-10), 1.16 (с, 3H, Me-11), 1.18-1.29 (м, 1H, H-6), 1.38-1.53 (м, 1H, H-9), 1.67-1.79 (м, 1H, H-8'), 1.82 (т, $J = 12.3$, 1H, H-4), 1.86-2.00 (м, 3H, H-4', H-7', H-10'), 3.18-3.30 (м, 1H, H-1), 3.29-3.34 (м, 2H, 2H-12), 4.62 (дд, $J = 11.7, 2.3$, 1H, H-3), 6.84 (дд, $J = 5.0, 3.5$, 1H, H-15), 6.89 (д, $J = 3.5$, 1H, H-14), 7.14 (дд, $J = 5.0, 1.2$, 1H, H-16). ^{13}C ЯМР (100.61 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 20.4 (к, C-11), 22.2 (т, C-7), 28.3 (т, C-8), 35.4 (т, C-10), 38.9 (д, C-9), 49.1 (т, C-4), 51.7 (д, C-6), 66.9 (т, C-12), 69.9 (с, C-5), 72.3 (д, C-3), 77.3 (д, C-1), 123.8 (д, C-14), 124.5 (д, C-16), 126.2 (д, C-15), 144.8 (с, C-13). Масс-спектр: m/z 282.1287; вычислено для $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{S}]^+$ 282.1284.

Рентгеноструктурный анализ проводили на дифрактометре Карра Арех II (Bruker, США) с CCD-детектором с использованием графитового монохроматора и $\text{MoK}\alpha$ -излучения ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Обработка экспериментальных данных выполнена с помощью комплекса программ APEX2 (APEX2 (Version 2.0), SAINT (Version 8.18c) и SADABS (Version 2.11)) (Bruker Advanced X-ray Solutions, США). Структуры расшифрованы прямыми методами и уточнены полноматричным методом наименьших квадратов по F^2 в анизотропно-изотропном приближении. Положения атомов водорода рассчитаны в модели наездника. Все вычисления проведены с использованием пакета SHELXTL-2018/3. Кристаллографические

данные депонированы в Кембриджский банк структурных данных (CCDC) под номерами CCDC 2168968 и 2168969.

(1*R*,2*S*,5*R*)-5-(Гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол (CCDC 2168968): $C_{10}H_{18}O_2$, $M = 170,24$, моноклинная сингония, пространственная группа $P2_1$, при 296 К: $a = 11.5798(8)$, $b = 7.1097(4)$, $c = 13.2094(9)$ Å, $\beta = 109.144(3)^\circ$, $V = 1027.37(12)$ Å³, $Z = 4$, $d_{\text{выч}} = 1.101$ г·см⁻³, $\mu = 0.074$ мм⁻¹, всего отражений 11262 ($\theta_{\text{max}} = 25.74^\circ$), 3938 независимых ($R_{\text{int}} = 0.0571$), 2829 [$I > 2\sigma(I)$], 223 параметра. $\text{Goof} = 0.947$, $R_1 = 0.0426$, $wR_2 = 0.0996$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.0724$, $wR_2 = 0.1163$ (все данные), максимальный/минимальный пик остаточной электронной плотности 0.12/–0.13 е·Å⁻³.

(1*R*,3*R*,4*S*)-3-Гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоксильная кислота (CDCC 2168969): $C_{10}H_{16}O_3$, $M = 184,23$, моноклинная сингония, пространственная группа $P2_1$, при 296 К: $a = 5.9661(2)$, $b = 11.1272(5)$, $c = 7.8484(4)$ Å, $\beta = 95.0116(16)^\circ$, $V = 519.03(4)$ Å³, $Z = 2$, $d_{\text{выч}} = 1.179$ г·см⁻³, $\mu = 0.086$ мм⁻¹, всего отражений 15008 ($\theta_{\text{max}} = 27.61^\circ$), 2411 независимых ($R_{\text{int}} = 0.0409$), 2248 [$I > 2\sigma(I)$], 127 параметров. $\text{Goof} = 1.015$, $R_1 = 0.0332$, $wR_2 = 0.0870$ [$I > 2\sigma(I)$], $R_1 = 0.0365$, $wR_2 = 0.0906$ (все данные), максимальный/минимальный пик остаточной электронной плотности 0.18/–0.12 е·Å⁻³.

При проведении химического синтеза CH_2Cl_2 пропускали через прокаленную Al_2O_3 . Разделение реакционной смеси проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (Macherey-Nagel 60-200 μ), элюент – этилацетат в гексане, от 20 до 100%, хлороформ. Анализ фракций осуществляли методом ГЖХ на приборе Agilent 7820A (США), кварцевая колонка HP-5 (сополимер 5%–дифенил–95%–диметоксисилоксан) длиной 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм толщина стационарной фазы 0.25 мкм, детектор пламенно-ионизационный, газ-носитель He (скорость потока 2 мл/мин., деление потока 99 : 1). Хромато-масс-спектры регистрировали на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5890/II (США) с квадрупольным масс-спектрометром HP MSD 5971 (США) в качестве детектора, кварцевая колонка HP-5MS 30000×0.25 мм, газ-носитель – гелий.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 (Германия) (400.13 MHz (^1H) и 100.61 MHz (^{13}C)). В качестве внутреннего стандарта использовали сигналы хлороформа (δ (H) 7.24, δ (C) 76.90 ppm), J указаны в Hz. Строение полученных соединений устанавливали на основе анализа спектров ЯМР ^1H и ^{13}C с привлечением двумерных спектров гомоядерной ^1H - ^1H корреляции (COSY, NOESY) и двумерных спектров гетероядерной ^{13}C - ^1H корреляции (HSQC, HMBC). Мультиплетность сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C определяли по спектрам, записанным в режиме J-модуляции (JMOD). Молекулярную массу и брутто-формулу определяли по данным масс-спектров, зарегистрированных на DFS спектрометре Thermo Scientific (США) в режиме полного сканирования в диапазоне 0-500 m/z , ионизация электронным ударом 70 эВ при прямом вводе образца.

Идентификацию продуктов биотрансформации (–)-изопулегола и их описание проводили на базе лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН.

2.21. Химический синтез

К раствору (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола (диола) (1 экв.) и альдегида (1 экв.) в CH_2Cl_2 (5 мл) добавляли монтмориillonит 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.

Синтез проводили на базе лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН.

2.22. *In silico* анализ (–)-изопулегола и его метаболитов

Экотоксичность и растворимость (–)-изопулегола и его производных рассчитывали с помощью программы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Оценка потенциальной острой и хронической токсичности в отношении водных и наземных организмов прогнозировалась на основании доступных данных по токсическим эффектам органических соединений различных химических классов с использованием компьютеризированного анализа структурно-функциональной взаимосвязи в молекулах.

Оценку предполагаемой биологической активности полученных производных (–)-изопулегола проводили на основе их структурных формул с использованием компьютерной программы PASS online (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Результат исследования биопотенциала веществ представлял собой список прогнозируемых видов биологической активности с оценкой вероятности обнаружения (Pa) и не обнаружения (Pi) последней. Наибольшая вероятность проявления биологической активности принималась за единицу.

2.23. Фитотоксичность (–)-изопулегола и его метаболитов

Определение фитотоксичности (–)-изопулегола и продуктов его трансформации в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В экспериментах использовали семена, всхожесть которых составляла 95%. Семена проращивали в течение 3 сут в стерильных чашках Петри с фильтровальной бумагой, пропитанной дистиллированной водой (5 мл). Затем проросшие семена обрабатывали супернатантами, полученными в результате 5 сут процесса биотрансформации (–)-изопулегола. Степень фитотоксичности определяли по истечении 7 сут по величине эффекта торможения роста корневой системы по формуле (7). Фитотоксическое действие считалось доказанным, если фитоэффект E_T составлял 20% и более.

$$E_T = (L_K - L_{OP}) / L_K \times 100 \% \quad (7),$$

где E_T – эффект торможения, %;

L_{OP} – средняя длина корней в опыте, мм;

L_K – средняя длина корней в контроле, мм.

2.24. Антимикробная активность

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. Растворенные в ДМСО (1 мг:10 мкл) (–)-изопулегол и продукты его биотрансформации вносили в лунки, содержащие бульон Мюллера-Хинтона, в начальной концентрации 50 мг/мл с последующим серийным двукратным разведением. В лунки добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии (2×10^6 клеток/мл). Планшеты выдерживали при оптимальной для тест-культур температуре 28 °C (*M. luteus* NCIMB 196) или 37 °C (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923) в течение 24 ч. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали путем окрашивания йодонитротетразолия хлоридом. Образование нерастворимого формаза и соответствующего пурпурного окрашивания свидетельствовало о наличии в лунках активно респирирующих клеток. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

2.25. Анальгетическая активность

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.

Тест «уксусные корчи» направлен на исследование острой висцеральной и соматически глубокой боли. Анальгезирующий эффект оценивали по способности исследуемых соединений уменьшать количество «корчей» (характерных движений животных, включающие сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины), вызванных введением уксусной кислоты по сравнению с контрольной группой животных.

Тест «горячая пластина» является методом для измерения анальгезирующего эффекта исследуемых веществ в ответ на термическое раздражение. Эффект оценивали по продолжительности нахождения животного на горячей пластине до первой «вокализации», облизывания подушечек передних и задних лап или подпрыгивания. Анальгетическую активность агентов в тесте «горячая пластинка» представляли в виде среднего латентного времени в группе и процентов защиты.

Полученные в ходе этих тестов данные сравнивали с действием препарата сравнения – диклофенаком натрия, вводимым в той же дозе.

Исследования анальгетической активности проводили на базе лаборатории фармакологических исследований Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН. Протокол заседания этического комитета № Р-14-2026-03-02 от 02.03.2026 г.

2.26. Статистическая обработка данных

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.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ К ТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА

В результате проведенного скрининга коллекционных штаммов актиномицетов рода *Rhodococcus* на способность к биоконверсии (–)-изопулегола установлено, что большинство из исследованных культур не способны использовать данный монотерпеноид в качестве источника углерода и энергии. Лишь отдельные штаммы, относящиеся к видам *R. opacus* (ИЭГМ 488) и *R. rhodochrous* (ИЭГМ 107, ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362), проявляли целевую активность. Стоит отметить, что по результатам масштабных скринингов целевую активность в отношении именно терпеновых субстратов чаще всего проявляют представители вида *R. rhodochrous* (Grishko *et al.*, 2013; Cheremnykh *et al.*, 2018; Luchnikova *et al.*, 2022, 2023). Для проведения дальнейших более углубленных исследований процесса биотрансформации был отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий наиболее эффективную биоконверсию (–)-изопулегола с образованием соединений, детектируемых на ТСХ с R_f 0,01 и 0,07 (Рисунок 22) (Ivshina *et al.*, 2022*).

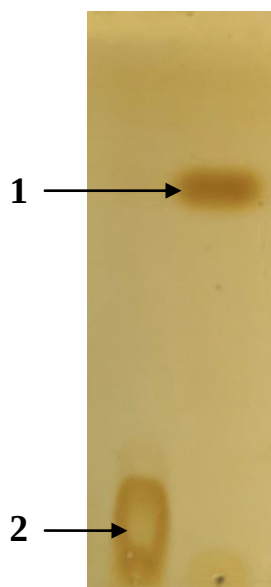


Рисунок 22 – ТСХ (–)-изопулегола (1, R_f 0,65) и продуктов его биотрансформации (2, R_f 0,01 и 0,07) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Ivshina *et al.*, 2022*)

Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в 2017 г. был выделен из верхних слоев торфа на Пальтинском месторождении торфа (Пермский край, Россия). Видовая принадлежность подтверждена анализом 16S рРНК (номер доступа GenBank MG645218.1) и полногеномной последовательности (номер доступа GenBank NZ_JANFQM000000000.1). Известно, что штамм способен использовать *n*-гексадекан в качестве единственного источника углерода, устойчив к тяжёлым металлам Cr^{6+} (40,0 мМ), Mo^{6+} и Zn^{2+} (5,0 мМ). Помимо конверсии (–)-изопулегола *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 проявляет трансформирующую активность в отношении монотерпеноидов (–)-*цис*-карвеола, (–)-*транс*-карвеола и (–)-L-карвона (http://www.iegmc.ru/strains/rhodoc/rhodoch/r_rhod1362.html).

ГХ-МС анализ этилацетатных экстрактов, полученных на 5 сут процесса биотрансформации, позволил выявить наличие двух ранее не идентифицированных производных (–)-изопулегола (**76**) с m/z 170 (**77**) и m/z 184 (**78**) (Рисунок 23).

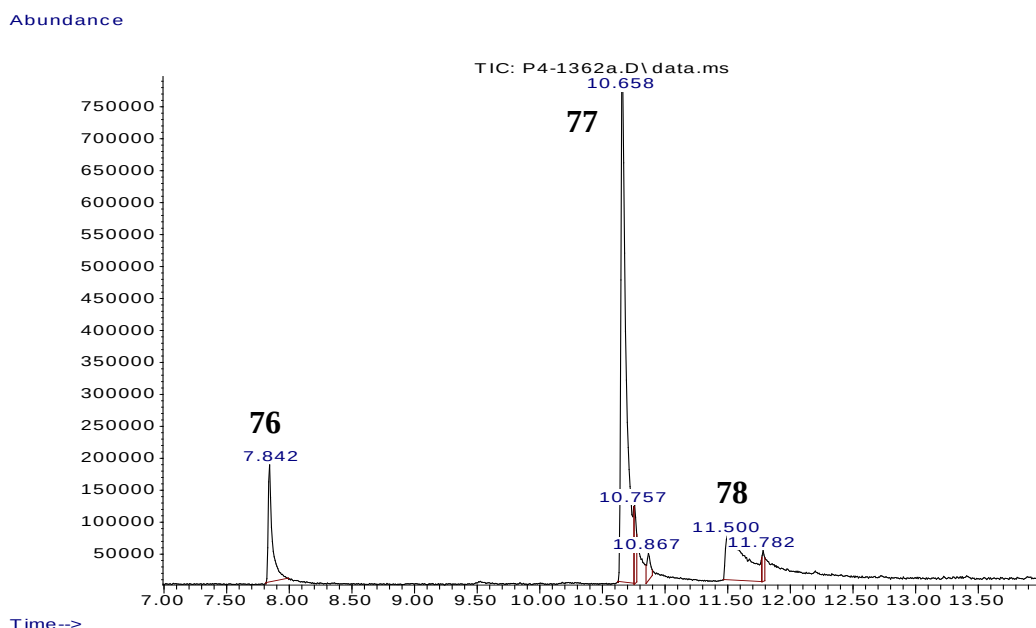


Рисунок 23 – Хроматограмма экстракта, полученного в процессе трансформации (–)-изопулегола (5 сут) штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: **76** – (–)-изопулегол, **77** – продукт m/z 170, **78** – продукт m/z 184 (Ivshina *et al.*, 2022*)

Ежедневный количественный ГХ-МС анализ экстрактов показал, что динамику процесса биотрансформации (–)-изопулегола оказывает влияние объем среды культивирования (Таблица 4). При культивировании в небольшом объеме

среды (25 мл) трансформация (–)-изопулегола штаммом *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362 сопровождалась образованием соединения **77** уже через 2 сут. К третьим сут культивирования данное соединение практически полностью превращалось в соединение **78**. В последующие дни эксперимента (4–5-е сут) наблюдалось увеличение содержания соединения **78**, сопровождавшееся конверсией исходного (–)-изопулегола. Полученные данные позволяют предположить, что соединение **77** является промежуточным продуктом биотрансформации (–)-изопулегола и подвергается последующему окислению с образованием соединения **78**.

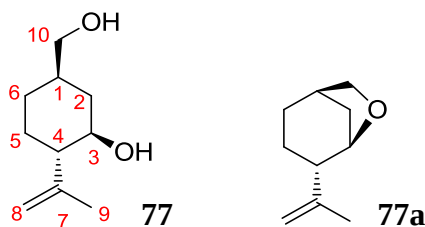
В то же время при увеличении объема среды культивирования до 100 мл процесс биотрансформации монотерпеноида характеризовался полным превращением (–)-изопулегола в соединение **78** уже на вторые сутки культивирования. Усиление биотрансформации при увеличении объема среды культивирования, вероятно, обусловлено особенностями массопереноса, в частности повышением эффективности газожидкостного переноса кислорода, определяемого коэффициентом массопередачи кислорода в системе «газ–жидкость» (Fernandes, 2006). Соединение **78**, по-видимому, является конечным продуктом биотрансформации (–)-изопулегола и, по результатам ТСХ, сохраняется в среде культивирования более 6 месяцев.

Таблица 4 – Состав экстракта (%), полученного в процессе биотрансформации (–)-изопулегола штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Объем среды	Сутки	(–)-Изопулегол ($m/z = 154$, 7,84 мин)	Соединение 77 ($m/z = 170$, 10,67 мин)	Соединение 78 ($m/z = 184$, 11,50 мин)
25 мл	2	15,2	84,8	–
	3	–	–	–
	5	следы	18,1	80,6
100 мл	2	–	–	100

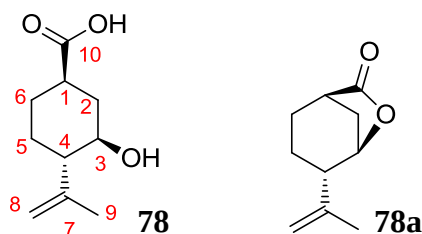
Глава 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Соединение **77** было выделено с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 и представляет собой белый порошок (R_f 0,01 (гексан/этилацетат 1:1)). Данное соединение является гидроксипроизводным (–)-изопулегола, что подтверждено присутствием молекулярно-ионного пика на m/z 170 в ГХ-МС и ЯМР спектральных данных. Структура **77a** рассматривалась как альтернатива соединения **77** и была отклонена на основании ^{13}C -ЯМР спектра раствора CDCl_3 с добавлением D_2O и НМВС спектральных данных. Присутствие гидроксильных групп на С-3 и С-10 было подтверждено экспериментом с добавлением D_2O . Вследствие изотопного эффекта в исследуемом растворе замещение ОН на OD привело к сильнопольному сдвигу дублета на 70,06 ppm и триплета на 67,77 ppm ($\Delta\delta$ 0,10 и 0,19 ppm соответственно). Отсутствие перекрестных пиков Н-3/С-10 и Н-10/С-3 в НМВС спектре также подтверждает структуру **77** для данного соединения.



Соединение **78** было выделено с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 и представляет собой белый порошок (R_f 0,07 (гексан/этилацетат 1:1)). Данное соединение является продуктом дальнейшего окисления диола **77** и содержит карбоксильную группу на С-10. Выяснение структуры соединения **78** было выполнено на основе ЯМР и HR-MS спектральных данных и подтверждены присутствием молекулярно-ионного пика на m/z 184 в ГХ-МС. Структура **78a** как альтернатива соединения **77** была отклонена на основе ^{13}C -ЯМР спектра раствора CDCl_3 с добавлением D_2O и НМВС спектральных данных. Присутствие гидроксильной группы на С-3 и карбоксильной группы на С-10 было подтверждено экспериментом с добавлением раствора D_2O . Вследствие изотопного эффекта в данном растворе замещение ОН на OD привело к

сильнопольному сдвигу дублета на 0.06 ppm и триплета на 67.77 ppm ($\Delta\delta$ 0.68 и 0.08 ppm соответственно). Отсутствие перекрестных пиков H-3/C-10 и H-10/C-3 в HMBC спектре также подтверждает структуру **78** для данного соединения.



Структуры диола **77** и гидроксикислоты **78** были подтверждены рентгеновской кристаллографией. Кристаллографические данные соединений **77** и **78** размещены в Кембриджском банке структурных данных (CCDC) под номерами CCDC 2168968 и 2168969, соответственно.

На основе ГХ-МС и ЯМР спектров полученных соединений предложена схема превращения (–)-изопулегола в процессе биоконверсии штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Рисунок 24).

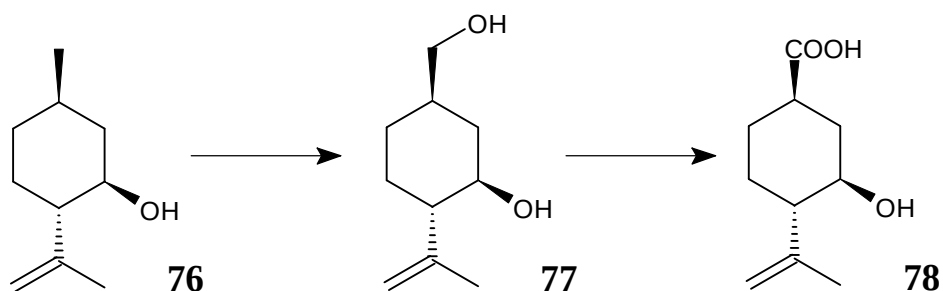


Рисунок 24 – Схема биоконверсии (–)-изопулегола штаммом *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Ivshina *et al.*, 2022*)

При разработке новых фармакологических соединений необходимо оценивать их возможное негативное воздействие на окружающую среду. Проведенный *in silico* анализ показал, что процесс биоконверсии (–)-изопулегола сопровождается образованием менее токсичных и менее гидрофобных соединений (Таблица 5). Так, острая токсичность соединений **77** и **78** по сравнению с (–)-изопулеголом снижалась в 6,9–9,8 раз и в 85,8–154,1 раз, хроническая – в 4,8–8,7 и 66,6–134,5 раз соответственно. При этом растворимость в воде повышалась в 1,1 и 20,4 раз соответственно.

Оценка биопотенциала показала, что соединения **77** и **78** в отличие от (–)-изопулегола с высоким коэффициентом вероятности могут использоваться в качестве респираторных аналептиков (0,568 и 0,686 соответственно), агентов профилактики рака мочевого пузыря (0,670 и 0,714 соответственно) и проявлять противоопухолевую активность (0,550 и 0,482 соответственно) (Таблица 6). Наряду с (–)-изопулеголом полученные соединения могут обладать ветрогонной (0,928–0,976), противоэземной (0,908–0,929), противовоспалительной (0,731–0,748) активностями, выступать в качестве иммуносупрессантов (0,720–0,755) и миорелаксантов (0,677–0,751), а также участвовать в индукции экспрессии генов иммунного ответа (0,730–0,747). Полученные *in silico* данные позволяют сузить спектр искомой биоактивности соединений *in vitro*.

Таблица 5 – *In silico* анализ экотоксичности и растворимости (–)-изопулегола и его производных

Тест-объект (показатель, экспозиция)	Концентрация, мг/л		
	(–)-Изопулегол	Соединение 77	Соединение 78
Растворимость в воде при 25°C, мг/л	308,6	345,2	6303
ECOSAR класс ^a	Neutral Organics	Neutral Organics	Neutral Organics- acid
Острая токсичность, мг/л			
Рыбы (ЛД ₅₀ , 96 ч)	7,39	72,75	1138,44
Дафнии (ЛД ₅₀ , 48 ч)	4,76	42,53	654,68
Зеленые водоросли (ЭД ₅₀ , 96 ч)	5,99	35,74	513,99
Хроническая токсичность, мг/л			
Рыбы (ЭД ₅₀ , 30 сут)	0,84	7,36	112,96
Дафнии (ЭД ₅₀ , 21 сут)	0,66	4,49	66,15
Зеленые водоросли (ЭД ₅₀ , 16 сут)	2,08	9,98	138,47

Примечание. ^aклассификация химического вещества, определяемая компьютерной программой ECOSAR на основе его структуры и функциональных групп;

используется для выбора математической модели при прогнозировании экотоксичности вещества

Таблица 6 – Предполагаемая биологическая активность (–)-изопулегола и его производных

Предполагаемая активность	(–)-Изопулегол		Соединение 77		Соединение 78	
	P _a	P _i	P _a	P _i	P _a	P _i
Ветрогонная	0,976	0,000	0,930	0,001	0,928	0,001
Противоэкземная	0,929	0,004	0,918	0,004	0,908	0,004
Нервно-мышечный блокатор ацетилхолина	0,751	0,003	0,677	0,005	0,682	0,005
Ингибитор бета-глюкуронидазы	–	–	0,670	0,005	0,714	0,004
Иммуносупрессивная	0,755	0,010	0,720	0,014	0,731	0,013
Стимулятор транскрипционного фактора NFκB	0,747	0,003	0,730	0,004	0,730	0,004
Ингибитор ретинол дегидрогеназы	0,738	0,002	0,739	0,002	0,693	0,002
Респираторный аналептик	–	–	0,568	0,026	0,686	0,016
Противовоспалительная	0,690	0,024	0,645	0,024	0,692	0,013
Противоопухолевая	–	–	0,550	0,057	0,482	0,002

Выявлено, что обработка семян супернатантом, полученным из образцов, содержащих минеральную среду и/или бактериальные клетки, приводила к торможению роста семян овса посевного *Avena sativa* L. Фитоэффект составлял 38,96% и 54,03% для контроля среды и биотического контроля соответственно. В связи с этим для последующих расчетов фитоэффекта в качестве исходного значения использовали биотический контроль. Установлено, что процесс трансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 сопровождался образованием метаболитов, которые не обладали выраженной

фитотоксичностью (Рисунок 25, Таблица 7). Согласно расчетам, фитозэффект, оказываемый продуктами трансформации **77** и **78**, составлял 13,7%. Исходное соединение также не оказывало негативного воздействия на исследуемые семена, в данном случае фитозэффект составил 3,93%.

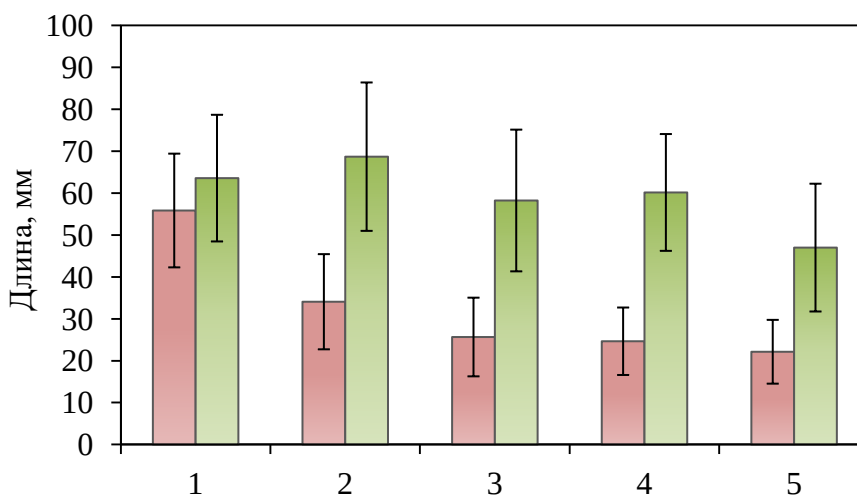


Рисунок 25 – Изменение морфометрических показателей овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием (–)-изопулегола и продуктов его трансформации. **1** – контроль (вода); **2** – контроль среды; **3** – биотический контроль; **4** – (–)-изопулегол; **5** – продукты биотрансформации (–)-изопулегола; ■ – длина корня; ■ – длина побега.

Таблица 7 – Фитозэффект, оказываемый (–)-изопулеголом и продуктами его биотрансформации

Вариант опыта	Длина корня, мм	Фитозэффект, %	Тест-реакция
Контроль (вода)	55,88±13,57	0	Норма
Контроль среды	34,11±11,36	38,96	Эффект торможения
Биотический контроль	25,69±9,39	54,03	Эффект торможения
(–)-Изопулегол	24,68±8,05	3,93	Норма (по отношению к БК)
Продукты трансформации	22,17±7,61	13,70	Норма (по отношению к БК)

По нашим данным, исследованные соединения не обладали выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Таблица 8). Тем не менее, гидроксикислота **78** проявляла наибольший ингибирующий эффект в отношении всех исследованных тест-культур по сравнению с ампициллином.

Таблица 8 – Антибактериальная активность (МПК, мг/мл) (–)-изопулегола и продуктов его биотрансформации

Соединение	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 196	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Диол 77	6,25	12,5	25
Гидроксикислота 78	6,25	3,125	6,25
Ампициллин	12,5	12,5	12,5
Канамицин	0,024	0,390	50

В связи с высоким прогностическим потенциалом противовоспалительной активности продуктов бактериальной трансформации (–)-изопулегола, выявленным методом *in silico* анализа (см. Таблицу 8), последующий этап работы был посвящен их направленной химической модификации для получения производных с целевым анальгетическим действием. Такой переход обусловлен единым патогенетическим механизмом данных видов активности. Воспалительный процесс зачастую сопровождается активным синтезом простагландинов, которые не только поддерживают воспаление, но и резко повышают чувствительность болевых рецепторов. Направленное изменение структуры полученных метаболитов рассматривалось как способ блокирования данного каскада, что позволяет рассчитывать на получение соединений с выраженным обезболивающим эффектом, способных подавлять как периферические, так и центральные механизмы боли.

Одним из фундаментальных методов стереоселективного синтеза новых гетероциклических соединений является циклизация Принса, представляющая собой взаимодействие карбонильных соединений с ненасыщенными спиртами или алкенами, катализируемое кислотами Льюиса или Бренстеда (Patrusheva *et al.*, 2018). Для взаимодействия с диолом **77** в качестве карбонильной компоненты были выбраны тιοфен-2-карбальдегид (**79a**) и ванилин (**79b**). Выбор альдегидов обусловлен выявленным ранее наличием существенной анальгетической активности у октагидрохроменолов, синтезированных из (–)-изопулегола и этих альдегидов (Nazimova *et al.*, 2016; Pavlova *et al.*, 2025).

При взаимодействии диола **77** с альдегидом **79a**, аналогично описанным ранее превращениям (–)-изопулегола с карбонильными соединениями, в качестве основного продукта образуется (*R*)-изомер октагидрохромена **80a** (Рисунок 26). Данный процесс сопровождается формированием минорных компонентов – диастереомера по положению гидроксильной и метильной групп (*S*)-**80a**, а также олефиновых соединений **81a**. Согласно данным ГХ-МС, соотношение (*R*)-**80a**: (*S*)-**80a**:**81a** в реакционной смеси составляет 88:7:5. С помощью колоночной хроматографии целевое соединение (*R*)-**80a** удалось выделить с выходом 65%.

Взаимодействие диола **77** с ванилином **79b** протекает аналогичным образом. Была получена смесь продуктов (*R*)-**80b**, (*S*)-**80b** и **81b** в соотношении 89:3:7, соответственно (Рисунок 26), из которой продукт **80b** был выделен с выходом 57%, его диастереомерная чистота составила 97:3.

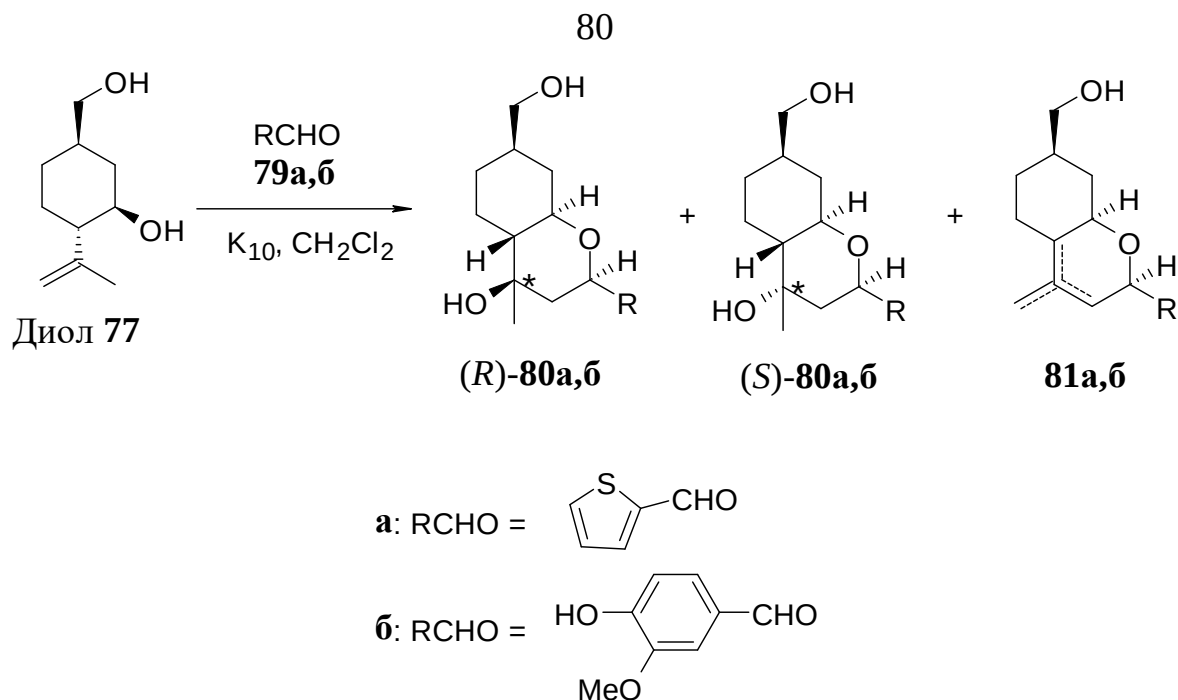


Рисунок 26 – Схема взаимодействия диола **77** с альдегидами

Анальгетическую активность полученных гетероциклических соединений изучали на мышах на стандартных моделях экспериментальной боли «уксусные корчи» и «горячая пластинка» в дозе 20 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак натрия. Как видно из представленных данных (Таблица 11), соединение **80б**, полученное из диола **77** и ванилина **79б** проявило существенную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи», хотя и оказалось неактивно в тесте «горячая пластинка». Соединение **80а**, синтезированное с использованием тиофен-2-карбальдегида **79а**, оказалось неактивно в обоих тестах.

Таким образом, впервые продемонстрировано, что полученный в результате бактериальной биотрансформации (–)-изопулегола монотерпеноид, (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексан-1-ол, может использоваться в качестве субстрата в реакции Принса с ароматическими и гетероароматическими альдегидами, что позволило получить соответствующие хиральные октагидрохромены. Одно из полученных гетероциклических соединений, синтезированное с использованием ванилина, проявило выраженную анальгетическую активность *in vivo*. Полученный результат подтверждает

высокую перспективность дизайна новых биологически активных соединений с использованием в качестве стартовой молекулы диола **77**.

Таблица 9 – Анальгетическая активность соединений производных (–)-изопулегола

Соединение	«Горячая пластинка», τ /сек		«Укусные корчи», N	
	Контроль	Агент (Защита, %) ^a	Контроль	Агент (МВЭ, %) ^b
Диол 77	12,3±1,2	11,3±0,9	8,6±0,8	8,8±1,1
Гидроксикислота 78	12,3±1,2	11,5±0,9	8,6±0,8	8,9±1,6
(<i>R</i>)- 80a	8,9 ± 0,7	10,3 ± 0,9	10,6 ± 2,4	10,5 ± 1,3
80b	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% * ($K_{\text{опыт}} - K_{\text{контроль}}$) / $K_{\text{контроль}}$, ^b % МВЭ (максимально возможный эффект) = 100% * ($K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}$) / $K_{\text{контроль}}$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Глава 5. ВЛИЯНИЕ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА НА КЛЕТКИ АКТИНОМИЦЕТОВ

Исследование респираторной активности родококков показало, что скорость потребления кислорода значительно снижалась на 3 сут культивирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 независимо от состава среды (Рисунок 27), что соотносится с полученными данными по динамике процесса трансформации, где основные превращения приходились на первые трое суток. В целом, внесение монотерпенового субстрата не оказывало значительного воздействия на дыхательную активность родококков. Та же тенденция была ранее выявлена при актинобактериальной трансформации пентациклического тритерпеноида бетулина (Grishko *et al.*, 2013).

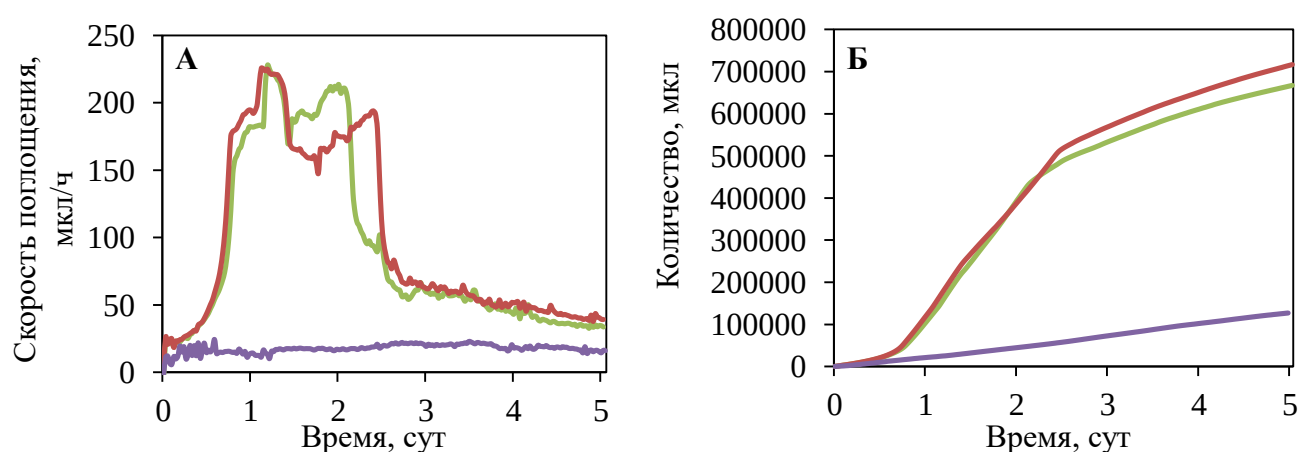


Рисунок 27 – Скорость потребления кислорода (А) и количество потребленного кислорода (Б) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола (—). Биотический контроль (—), абиотический контроль (—) (Ivshina *et al.*, 2022*)

Оценка количества биомассы (Рисунок 28А) и значений кислотности (Рисунок 28Б) 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.

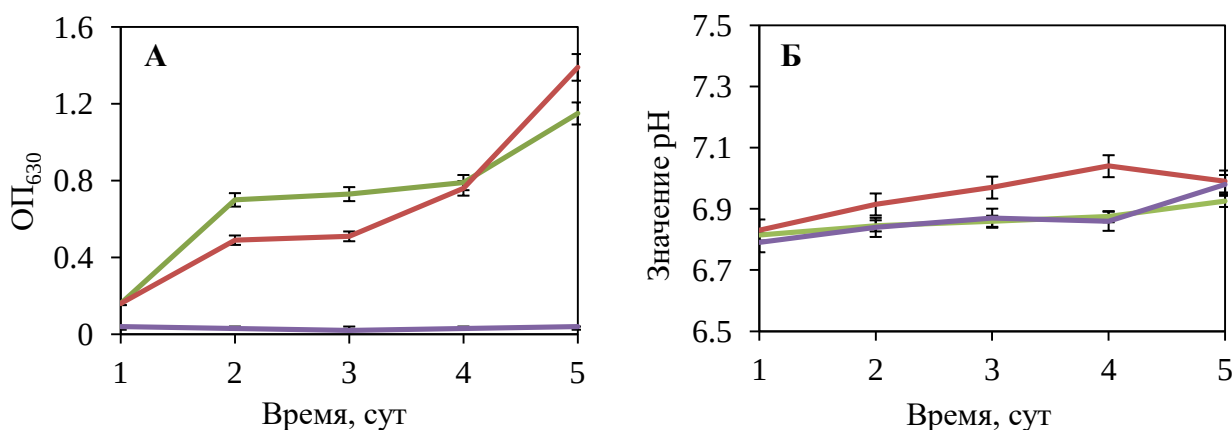


Рисунок 28 – Динамика изменения оптической плотности (А) и изменения рН среды культивирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Б) в присутствии (—)-изопулегола (—). Биотический контроль (—), абиотический контроль (—) (Ivshina *et al.*, 2022^{*})

Установлено, что внесение (—)-изопулегола в среду культивирования *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 не оказывало существенного влияния и на размеры клеток, относительная площадь клеточной поверхности которых сохранялась в пределах 3,06–3,30 мкм⁻¹ (Таблица 10). Схожий эффект был ранее выявлен при трансформации дитерпеноида дегидроабиетиновой кислоты штаммом *R. erythropolis* ИЭГМ 267, где несмотря на увеличение общих размеров клеток, относительная площадь поверхности сохранялась на одном уровне (Cheremnykh *et al.*, 2018). Интегральные параметры (шероховатость и дзета-потенциал) поверхности клеток также не изменялись в присутствии (—)-изопулегола (Таблица 11).

Таблица 10 – Морфометрические параметры клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Варианты опыта	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь, мкм ²	Объем, мкм ³	Относительная площадь, мкм ⁻¹
Биологический контроль	1,58±0,22	1,12±0,14	4,74±0,69	1,55±0,31	3,06±0,26
(—)-Изопулегол	1,33±0,26	1,15±0,09	4,50±0,33	1,39±0,16	3,24±0,21

Таблица 11 – Измерение электрокинетического потенциала и шероховатости клеточной поверхности *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Варианты опыта	Электрокинетический потенциал, мВ	Шероховатость, нм
(–)-Изопулегол	-33,3±8,00	231,5±83,20
Биологический контроль	-36,8±6,90	151,4±10,30

Окрашивание бактериальных клеток с помощью флуоресцентного красителя нильский красный позволило выявить наличие внутриклеточных липидных включений как в присутствии (–)-изопулегола, так и без него (Рисунок 29). Ранее было показано, что при росте на углеводородных субстратах родококки продуцируют полигидроксиалканоаты (ПГА) в качестве запасных веществ, позволяющих клетке нормально функционировать в стрессовых условиях и дисбалансе питательных элементов (Alvarez *et al.*, 1996). Детектированные включения, предположительно, также являются ПГА. Стоит отметить, что количество и размер липидных включений не сильно колеблется в зависимости от состава среды, что косвенно подтверждено определением процентного содержания общих липидов от сухого веса клеток ($8,2 \pm 0,4\%$ и $8,8 \pm 0,4\%$, соответственно).

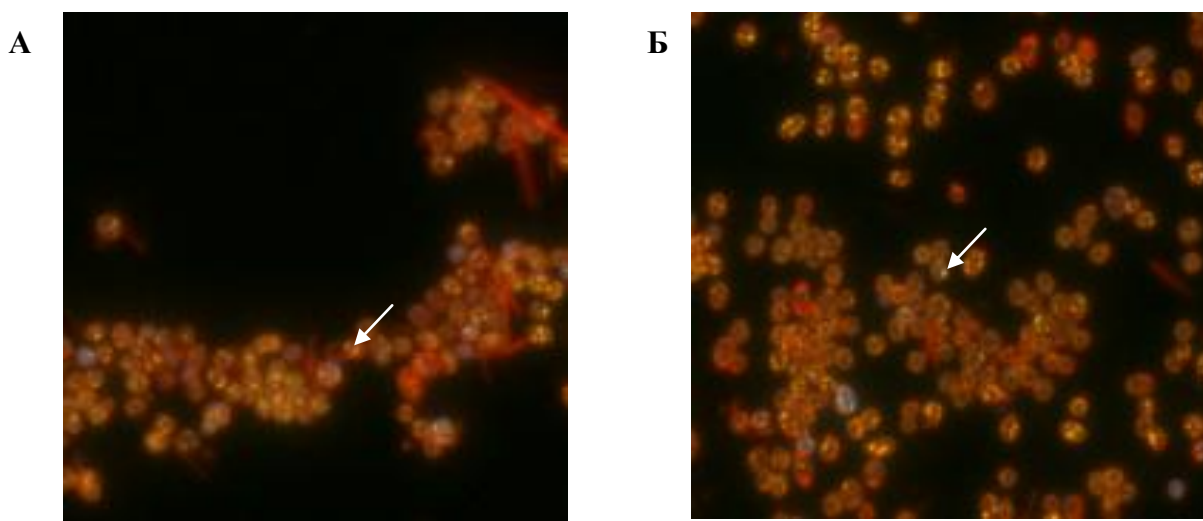


Рисунок 29 – Флуоресцентная микроскопия клеток *R. rhodochrous* 1362 в присутствии (–)-изопулегола (А), биотический контроль (Б). Белыми стрелками обозначены липидные включения (Ivshina *et al.*, 2022*)

Анализ АСМ и совмещенных АСМ-КЛСМ изображений позволил выявить скопление капель (–)-изопулегола на поверхности бактериальных клеток (рисунок 30А-Г). 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).

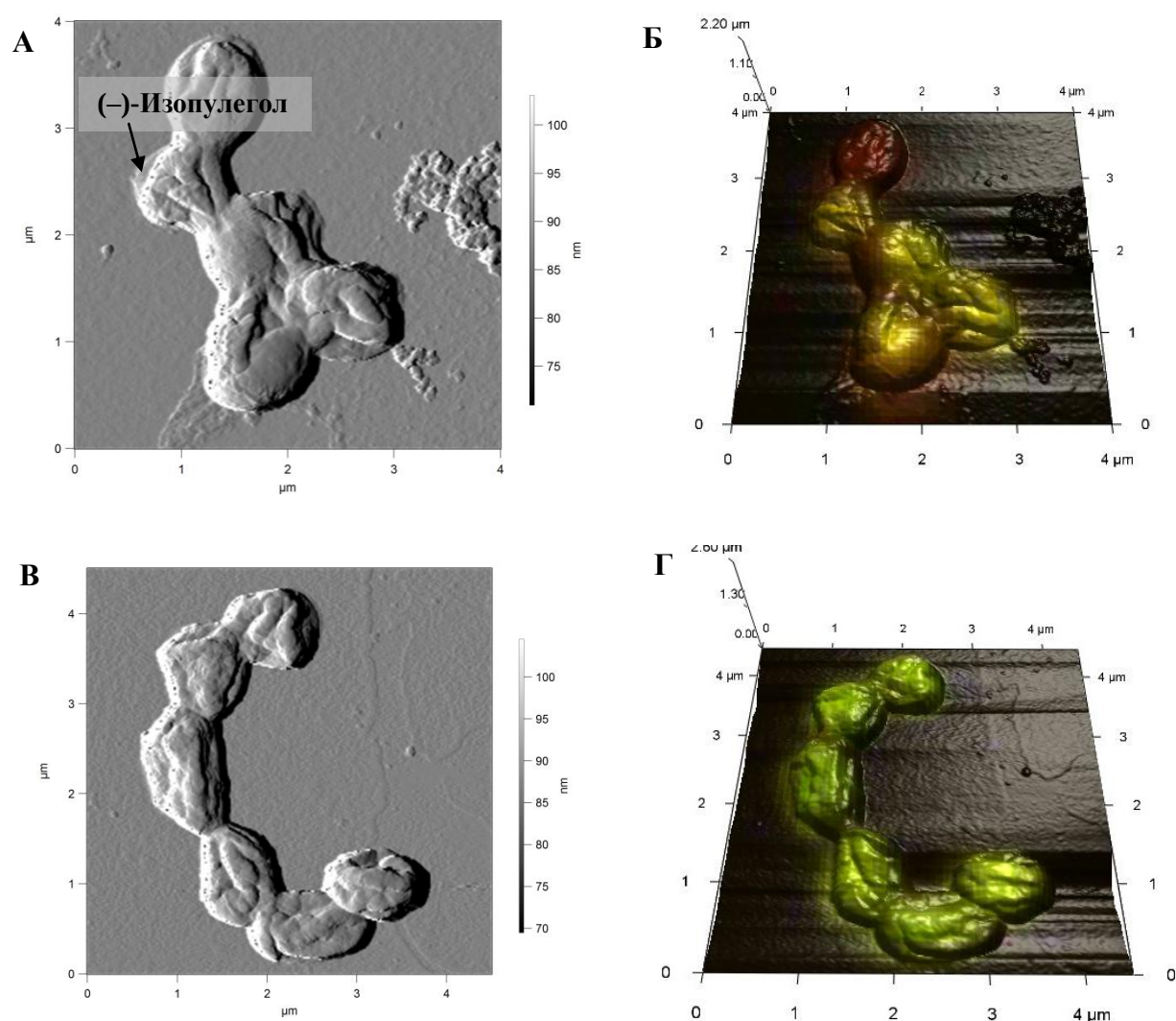


Рисунок 30 – АСМ и совмещённые АСМ-КЛСМ изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола (А, Б), биотический контроль (В, Г) (Ivshina *et al.*, 2022*)

Известно, что в процессе окисления сложных органических соединений образуются активные формы кислорода, в детоксикации которых участвует фермент каталаза. Каталазная активность бактерий является индикатором их способности к окислению токсикантов и способствует выживанию бактерий в экстремальных условиях окружающей среды (Gogoleva *et al.*, 2012). Кроме того, данный адаптационный механизм может приводить к усилению мутагенеза в бактериальных клетках и, как следствие, приобретению ими более широкой субстратной специфичности и способности эффективно окислять новые субстраты (Perez-Pantoja *et al.*, 2013). В нашем случае внесение (–)-изопулегола в среду культивирования клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 не оказывало влияния на уровень каталазной активности клеток (Рисунок 31), что подтверждает отсутствие его токсического эффекта.

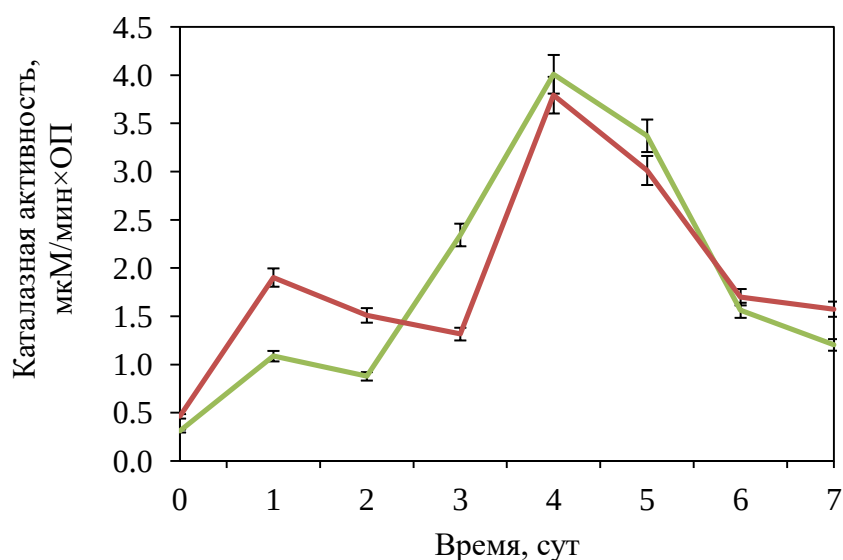


Рисунок 31 – Динамика каталазной активности клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (—) и без (–)-изопулегола (—)

Сравнительный анализ ультратонких срезов, полученных с помощью ПЭМ не выявил значимых отличий в морфологии клеток, выращенных в присутствии (Рисунок 32Г–Е) и без (–)-изопулегола (Рисунок 32А–В). Клетки в обоих вариантах оставались интактными, без признаков лизиса или деформации (Рисунок 32А, Г). Делящиеся клетки обладали наружным капсульным слоем (в виде выростов), многослойной клеточной стенкой различной электронной

плотности (характерной для родококков) и интактной цитоплазматической мембраной. В мелкозернистой цитоплазме четко визуализировались нуклеоид, несколько электронно-плотных частиц (предположительно, состоящих из полифосфатов) и электронно-прозрачные липидные включения, а также сферические мембраноподобные структуры (Рисунок 32Д). В культуре, выращенной в присутствии (–)-изопулегола, у некоторых клеток наблюдалась более выраженная слоистость клеточной стенки и периферическое расположение полифосфатных частиц на сферах (Рисунок 32Д), что несколько отличало их от контрольных культур. Внесение (–)-изопулегола на агаризованную среду с уже выращенными культурами в тесте на острую токсичность (для имитации высоких концентраций) вызывало выраженные деструктивные и цитотоксические эффекты (Рисунок 32Ж, З).

Анализ элементного состава клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 показал, что внесение (–)-изопулегола не сопровождалось заметными изменениями во внутриклеточном пуле и распределении углерода, кислорода, фосфора и калия (Рисунок 33). У отдельных клеток, выращенных в присутствии (–)-изопулегола, наблюдалось более высокое накопление калия по сравнению с биотическим контролем. 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). Примечательно, что при росте в минеральной среде RS в присутствии (–)-изопулегола в качестве единственного источника углерода и энергии популяция *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 была гетерогенной. У части клеток отмечалось истощение запасов ключевых элементов, тогда как другие клетки сохраняли нормальный уровень их содержания. Сниженный или чрезмерно бедный внутриклеточный пул биологически важных элементов может указывать на неактивное или умирающее состояние клеток.

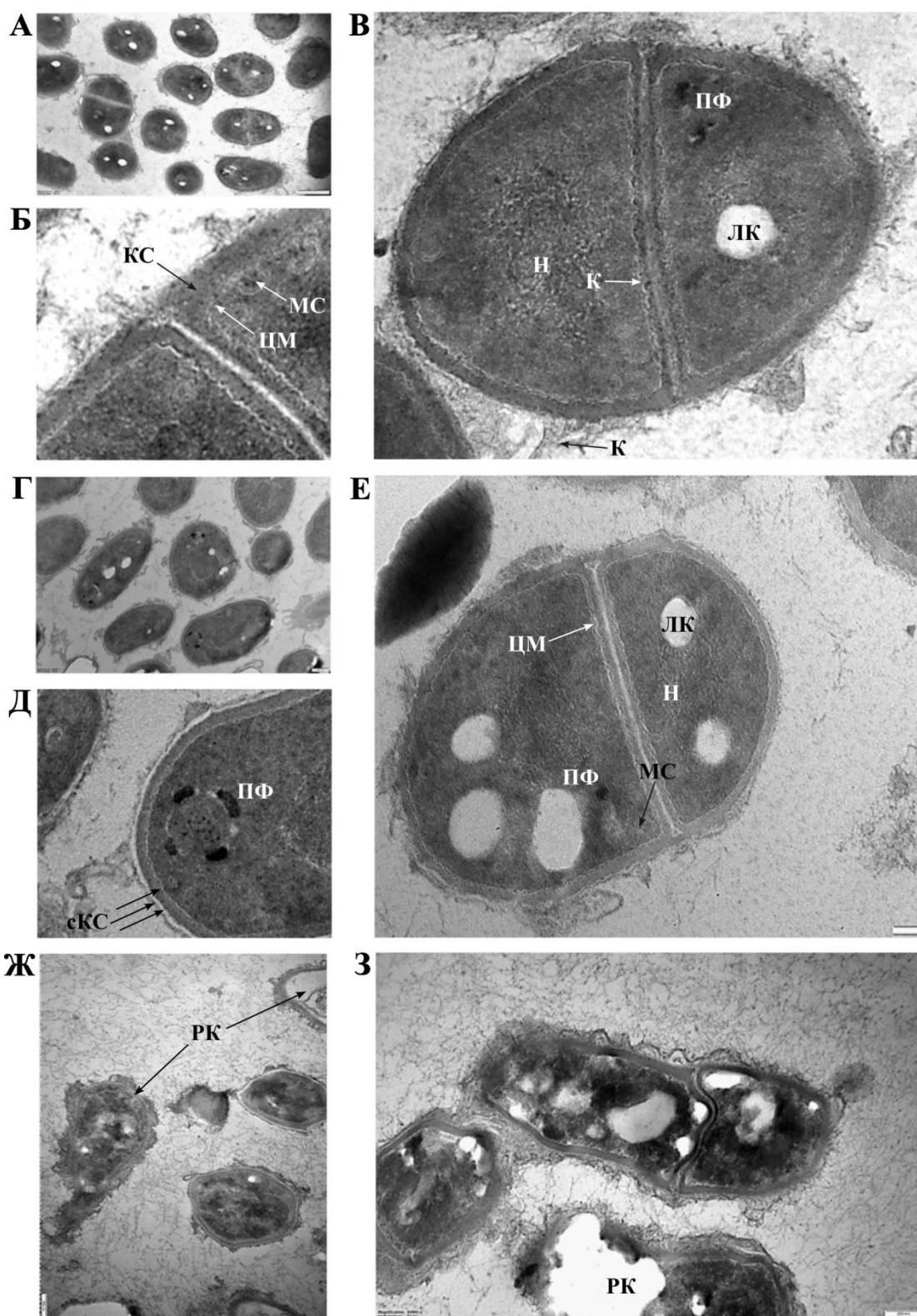


Рисунок 32 – ПЭМ клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (А–В, биотический контроль), выращенных в присутствии (–)–изопулегола (Г–З): К, капсульный слой; КС, клеточная стенка; сКС, слои клеточной стенки; ЦМ, цитоплазматическая мембрана; Н, нуклеоид; ПФ, полифосфаты; ЛК, липидные капли; МС, мембраноподобные структуры; РК, разрушенные клетки. Масштаб линейки: 200 нм (Ivshina et al., 2022*)

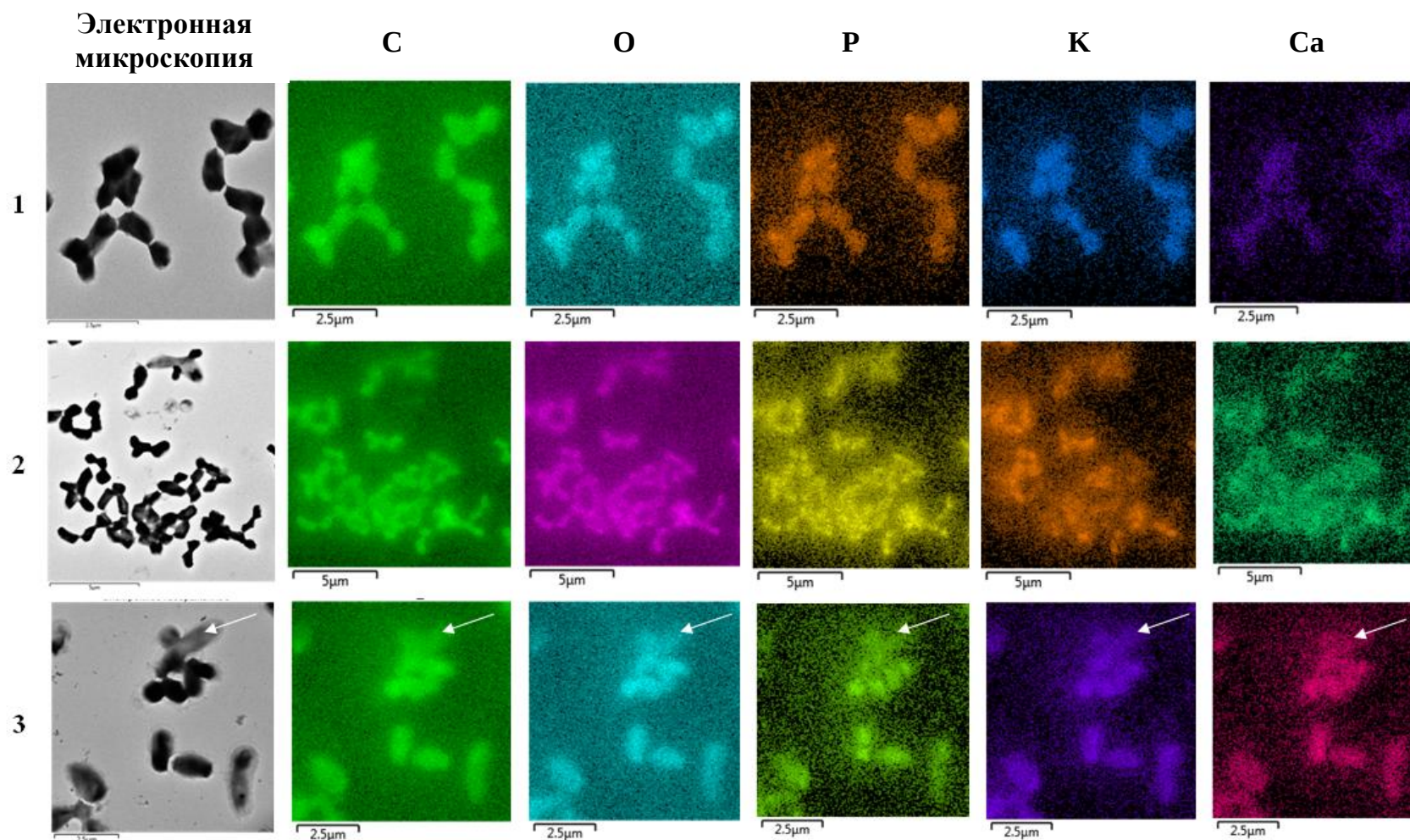


Рисунок 33 – Элементный состав клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, определенный путем картирования с помощью рентгеновского микроанализа. Распределение отдельных химических элементов отмечено цветом: **1**, клетки, выращенные на МПА (биотический контроль); **2**, клетки, выращенные на МПА в присутствии (–)-изопулегола; **3**, клетки, выращенные в среде RS в присутствии (–)-изопулегола в качестве единственного источника углерода и энергии. Стрелкой обозначена клетка с дефицитом элементов. (Ivshina *et al.*, 2022*)

Глава 6. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА

Одним из развивающихся подходов в биотехнологии является использование наноматериалов с целью оптимизации биокаталитических процессов. Наноматериалы, такие как углеродные нанотрубки, металлические наночастицы и металлоорганические каркасы, демонстрируют уникальные каталитические свойства, высокую площадь поверхности и возможность модификации, что позволяет значительно повысить эффективность ферментативных реакций, устойчивость биокатализаторов и выход целевых продуктов (Misson *et al.*, 2015; Khoo *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2025).

Для проведения наномодификации клеточной поверхности клеток штамма эффективного биотрансформатора (–)-изопулегола *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 были исследованы различные гетерогенные носители: силикагель, лапонит, оксиды магния (MgO) и алюминия (Al₂O₃), нанотрубки галлуазита (НГ) (Таблица 12). По данным спектров ГХ-МС в присутствии данных гетерогенных носителей в концентрации 0,1 г/л в качестве единственного метаболита образуется гидроксикислота **78**. Увеличение концентрации Al₂O₃ до 0,25 г/л привело к повышению степени конверсии (–)-изопулегола, однако одновременно наблюдалось изменение направления реакции в сторону образования диола **77** вместо гидроксикислоты **78**. Внесение нанотрубок галлуазита в меньшей концентрации (0,1 г/л), способствовало более эффективной конверсии исходного спирта в диол **77**. Использование MgO и силикагеля в концентрации 0,25 г/л вызвало снижение уровня конверсии (–)-изопулегола и уменьшение выхода целевого диола **77**.

Таблица 12 – Изменения в составе этилацетатного экстракта (%) через 3 суток во время биотрансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии гетерогенных носителей

Гетерогенный носитель	Концентрация, г/л	Содержание в экстракте ^а , %		
		(–)-Изопулегол	Диол 77	Гидроксикислота 78
Силикагель	0,1	–	–	100
	0,25	24	27	–
Лапонит	0,1	–	–	100
	0,25	н/д ^б	н/д	н/д
MgO	0,1	–	–	100
	0,25	38	5,2	–
Al ₂ O ₃	0,1	–	–	100
	0,25	1,3	28,1	–
НГ	0,1	–	100	–
	0,25	н/д	н/д	н/д
Без носителя	–	45,7	–	54,3

Примечание. ^аДанные приведены на 3 сутки культивирования; ^бн/д – нет данных.

Таким образом, показано, что небольшие концентрации (0,1 г/л) гетерогенных носителей обеспечивают максимальную эффективность трансформации (–)-изопулегола в гидроксикислоту, в то время как введение носителей в концентрации 0,25 г/л способствует аккумуляции промежуточного соединения – диола. Полученные результаты представляют ценность для дальнейшего изучения оптимизации процессов синтеза фармакологически значимых производных монотерпеноидов.

Еще одним из распространенных способов оптимизации процесса бактериальной трансформации сложных органических соединений является закрепление бактериальных клеток на поверхности или в толще носителя (Ivshina *et al.*, 2012; Kylosova *et al.*, 2016). Иммобилизация клеток обеспечивает их стабильность, повышенную устойчивость к воздействиям внешней среды (температуре, pH и др.), высокую производительность и возможность многократного использования, что устраняет необходимость в регулярном

культивировании целевого штамма. В связи с этим нами были протестированы различные носители для закрепления клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, такие как полипропиленовые диски, техническая ткань и гранулы поливинилового спирта (ПВС). Использование приема адсорбционной иммобилизации оказалось неэффективно в связи с низким коэффициентом адсорбционной емкости носителей в отношении родококков, которая составляла $3,98 \pm 0,35\%$ и $3,15 \pm 0,20\%$ для полипропиленовых дисков и фрагментов технической ткани соответственно. Тогда как биокатализаторы с наилучшими параметрами были получены путем иммобилизации родококков в криогель на основе ПВС (Maltseva *et al.*, 2025*).

Иммобилизация клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в гранулы ПВС позволила сохранить их функциональную активность в отношении (–)-изопулегола в течение 13 циклов эксплуатации, что свидетельствует о перспективности использования полученного биокатализатора для оптимизации и масштабирования процесса биотрансформации монотерпеноида с целью получения фармакологически ценных производных. Во время первых циклов эксплуатации инокулированных гранул ПВС, вероятно, происходит активный рост и процесс адаптации иммобилизованных клеток к условиям культивирования, в частности к присутствию субстрата, что приводит к достижению их максимальной каталитической активности. По данным ГХ-МС, основными продуктами биотрансформации (–)-изопулегола **76** иммобилизованными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 являются диол **77**, гидроксикислота **78** и (S)-эпоксид изопулегола с преимущественным образованием гидроксикислоты. Побочный продукт, идентифицированный нами как (S)-эпоксид изопулегола, представляет собой коммерчески доступное соединение и не демонстрирует значительного потенциала биологической активности.

Селективность образования гидроксикислоты **78** возрастает от 1 к 5 циклу, затем снижается, достигая минимума в 8 цикле, после чего в последующих циклах (с 9 по 12) вновь увеличивается до 72,5–82,4% (Рисунок 34). Выраженное снижение селективности в 8 цикле, по-видимому, связано с усиленным

образованием (S)-эпоксида изопулегола, а также с накоплением побочных продуктов (m/z 156 и 182, соответственно). Восстановление высокой селективности в 9–12 циклах указывает на возможную катаболическую стабилизацию процесса приспособления клеток к меняющимся условиям существования.

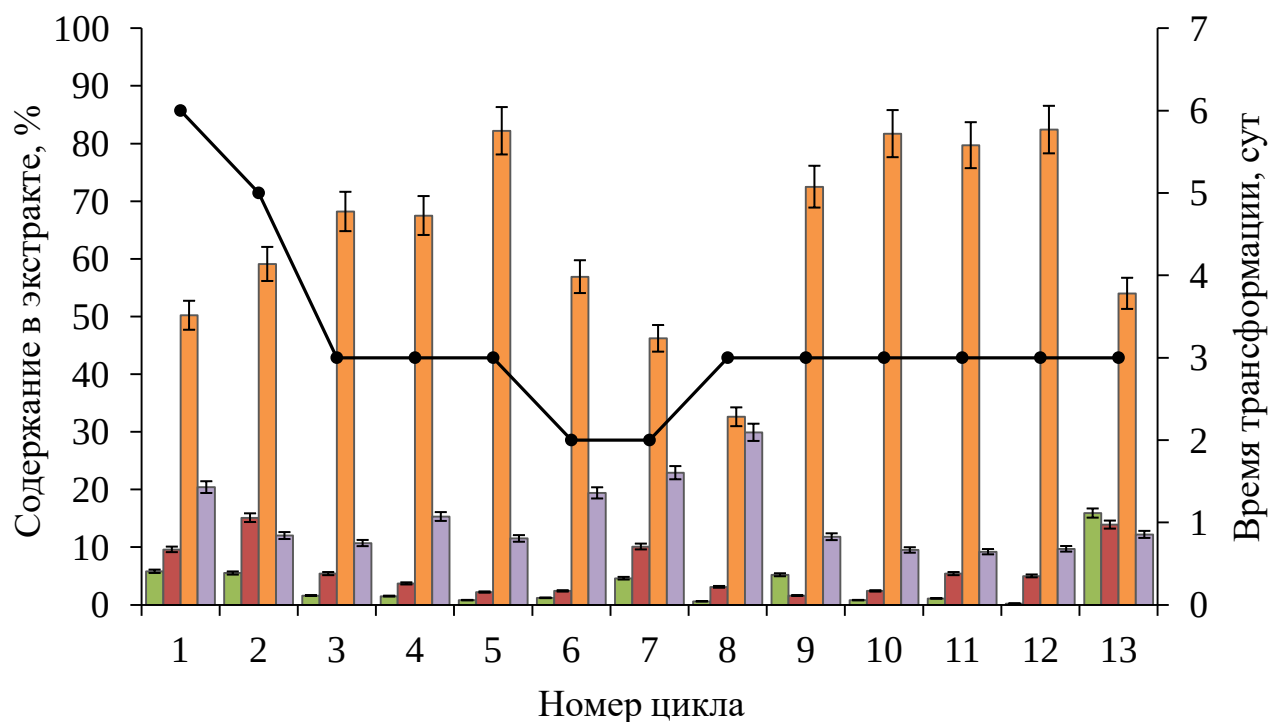


Рисунок 34 – Биотрансформация (–)-изопулегола иммобилизованными клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: ■, (–)-изопулегол 76; ■, диол 77; ■, гидроксикислота 78; ■, (S)-эпоксид изопулегола; —●—, время трансформации, сут (Maltseva *et al.*, 2025*)

Для оценки микроморфологических характеристик свободных и иммобилизованных бактериальных клеток использовали методы электронной микроскопии. Для СЭМ и ПЭМ готовили образцы гранул ПВС с закрепленными в них клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в исходном виде и после 8 циклов непрерывного использования биокатализатора. Как видно из Рисунка 35А–В, инокулированные гранулы к 8 циклу их эксплуатации приобретали выраженную оранжевую пигментацию, характерную для колоний *R. rhodochrous* и свидетельствующую о колонизации носителя родококками. Исследование инокулированных гранул ПВС с использованием СЭМ и ПЭМ выявило скопления

клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в порах криогеля, образующихся в результате процесса замораживания-оттаивания (Рисунок 35Г, обозначено стрелкой), а также формирование обособленных компактных многоклеточных агрегатов (Рисунок 35Д).

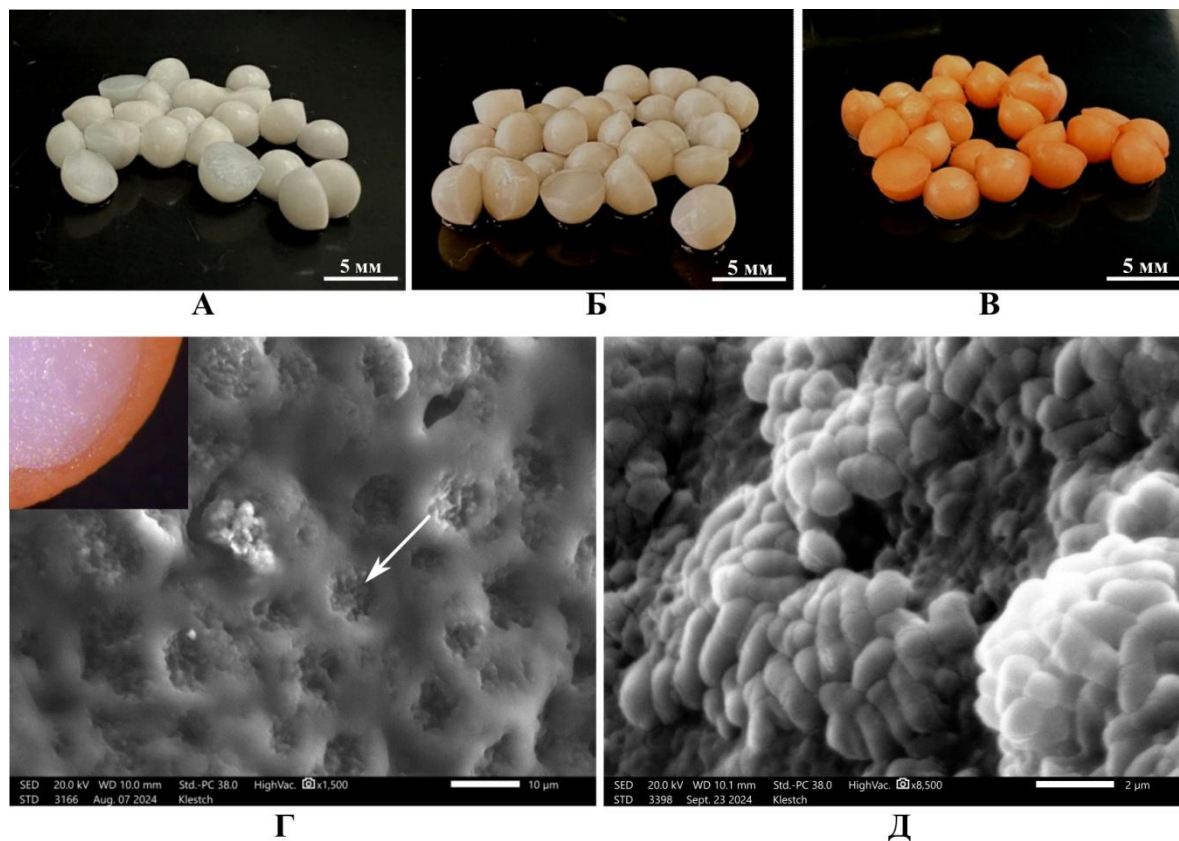


Рисунок 35 – Внешний вид гранул (А–В) и СЭМ (Г, Д): А, стерильные гранулы после 8 циклов с (–)-изопулеголом; Б, инокулированные гранулы после 1 цикла с (–)-изопулеголом; В, инокулированные гранулы после 8 циклов с (–)-изопулеголом; Г, Д, поверхность инокулированных гранул после 8 циклов с (–)-изопулеголом. Стрелкой обозначено скопление клеток в макропорах ПВС (Maltseva *et al.*, 2025*).

На ультратонких срезах родококков, закрепленных в матрицу ПВС, не были выявлены внутриклеточные липидные включения (Рисунок 36А). По-видимому, носитель защищает клетки от негативного воздействия внешней среды, что, в свою очередь, снижает потребность клеток в дополнительном запасании эндогенных резервных веществ. Свободные клетки характеризовались наличием дифференцированного внешнего капсульного слоя в виде специфических выростов (Рисунок 36Б). Поскольку клеточная стенка (КС) играет ключевую роль

при взаимодействии бактерий с субстратом, можно предположить, что увеличение площади клеточной поверхности за счет гипертрофированного роста КС направлено на формирование своеобразного резервуара, обеспечивающего фиксацию поступающего субстрата и последующее его окисление. Клетки, закрепленные в матрице ПВС, напротив, не испытывают необходимости в данном приспособлении, поскольку сама структура носителя способствует аккумуляции субстрата в его макропорах и более свободному использованию бактериальными клетками.

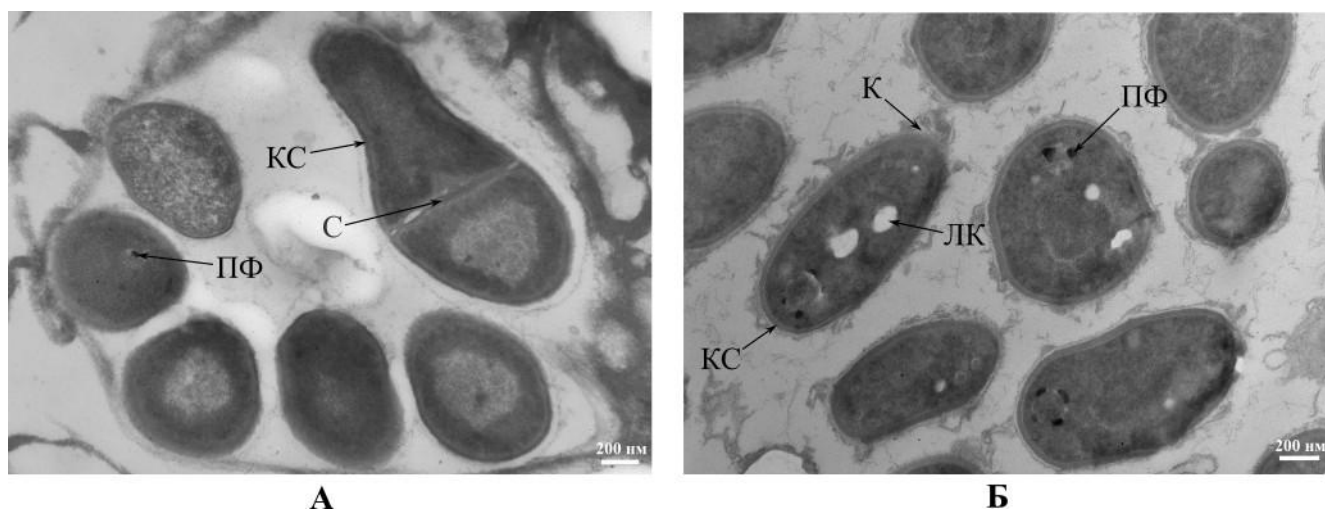


Рисунок 36 – ПЭМ иммобилизованных (А) и свободных (Б) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 с (–)-изопулеголом: К, капсульный слой; КС, клеточная стенка; ПФ, полифосфаты; ЛК, липидные капли; С, септа (Maltseva *et al.*, 2025*)

Иммобилизованные клетки, использующиеся в течение 8 циклов биотрансформации (–)-изопулегола, характеризовались выраженным повышенным содержанием магния, фосфора, калия и кальция, а также увеличением разнообразия регистрируемых элементов, что выражалось в появлении в бактериальных клетках отдельных химических элементов: натрия, алюминия, кремния и железа (Рисунок 37).

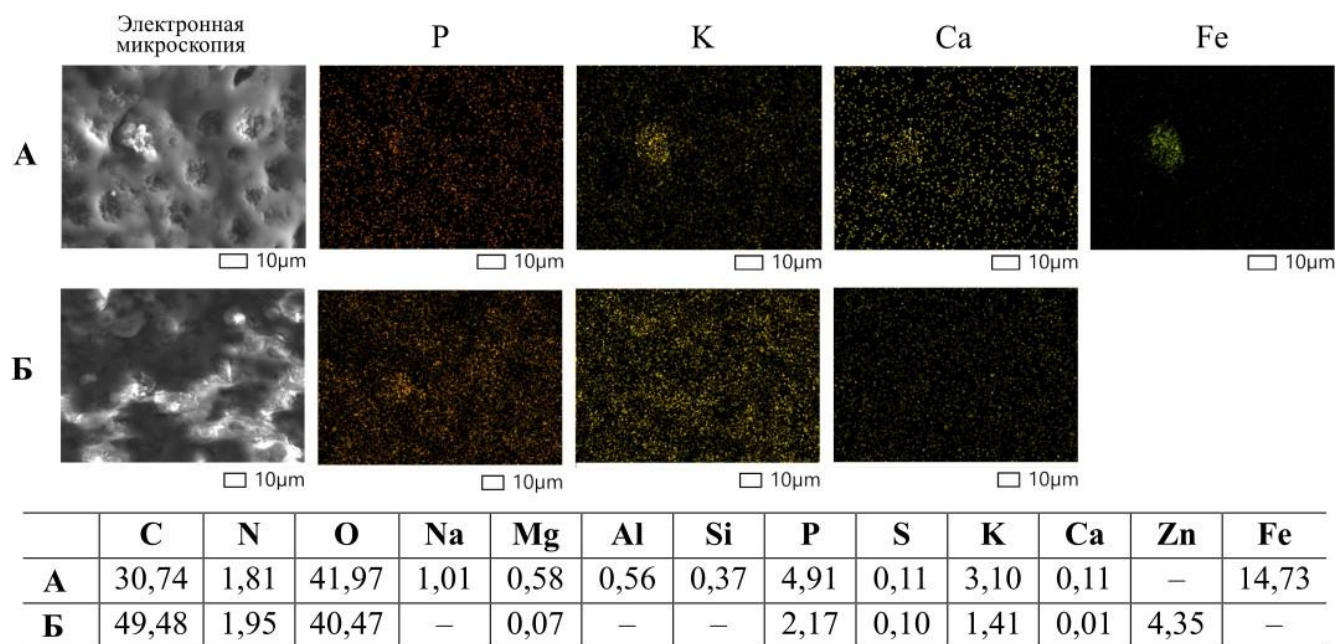


Рисунок 37 – Элементное картирование и состав (масс. %) иммобилизованных в криогеле ПВС клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (А) и без (Б) (–)-изопулегола, определенный путем картирования с помощью рентгеновского микроанализа. Распределение отдельных химических элементов отмечено цветом (Maltseva *et al.*, 2025*)

Известно, что железо играет ключевую роль в процессах клеточного дыхания и метаболизма клеток и является важным компонентом редокс-партнеров множества ферментов, что существенно влияет на каталитическую активность бактерий (Bradley *et al.*, 2020). Например, оксигеназы семейства цитохром Р450, участвующие в превращениях монотерпеноидов родококками (Grogan *et al.*, 2002; Giang *et al.*, 2022, 2023, 2024), содержат в своей структуре железо-порфириновый комплекс. Кроме того, отрицательно заряженные бактериальные клетки способны притягивать катионы металлов, нейтрализация которых приводит к повышению степени гидрофобности клеточной поверхности и, как следствие, способности адсорбировать гидрофобные органические соединения (Liu *et al.*, 2017). По данным Liu с соавт. (2021), присутствие ионов железа в среде культивирования родококков, действительно, индуцирует активацию транспортных систем, ответственных за поглощение полиароматических углеводородов, в частности пирена, увеличивая при этом

скорость его биодegradации (Liu *et al.*, 2021). В нашем случае, железо, по-видимому, способствует интенсификации целевой биокаталитической активности иммобилизованных клеток с использованием разных механизмов, в том числе активации окислительных ферментов и модификации клеточной поверхности.

Одной из важных эксплуатационных характеристик биокатализаторов является гарантированно сохраняемая жизнеспособность иммобилизованных бактериальных клеток. Определение количества жизнеспособных клеток сопряжено с рядом трудностей, связанных с тем, что иммобилизованные микроорганизмы прочно закреплены в матрице носителя и не могут быть извлечены без нарушения целостности клеток. В связи с этим использование прямых методов подсчета жизнеспособных клеток не представляется возможным. Альтернативными методами являются оценка респираторной активности, а также использование флуоресцентного красителя Live/Dead.

С использованием данного красителя установлено, что поверхностные поры гранул к 13-му циклу биотрансформации (–)-изопулегола содержали нежизнеспособные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, тогда как в течение 1–12 циклов работы биокатализатора в аналогичных зонах преобладали активно метаболизирующие клетки (Рисунок 38А, Б). Документированное «запечатывание» поверхностных пор (Рисунок 38Б) коррелирует со снижением биокаталитической активности системы, что подтверждается данными ГХ-МС (см. Рисунок 34). Такой феномен, вероятно, связан с исчерпанием предела ёмкости пор носителя при сохранении диффузии питательных веществ. Это приводит к прогрессирующему накоплению некротической бактериальной биомассы, формирующей механический барьер, который может способствовать блокировке транспорта субстрата (Benítez-Mateos *et al.*, 2020; Bisht *et al.*, 2023). Примечательно, что в более глубоких слоях носителя соотношение живых и мёртвых клеток родококков оставалось стабильным даже после многократного использования иммобилизованного биокатализатора (Рисунок 38В, Г), что указывает на гетерогенность бактериальной популяции в биокатализаторе, подобной структуре биопленок. Поверхностные зоны в большей степени

подвержены стрессовым воздействиям, в то время как внутренние сохраняют более стабильные условия, поддерживающие жизнеспособность клеток в течение длительного времени.

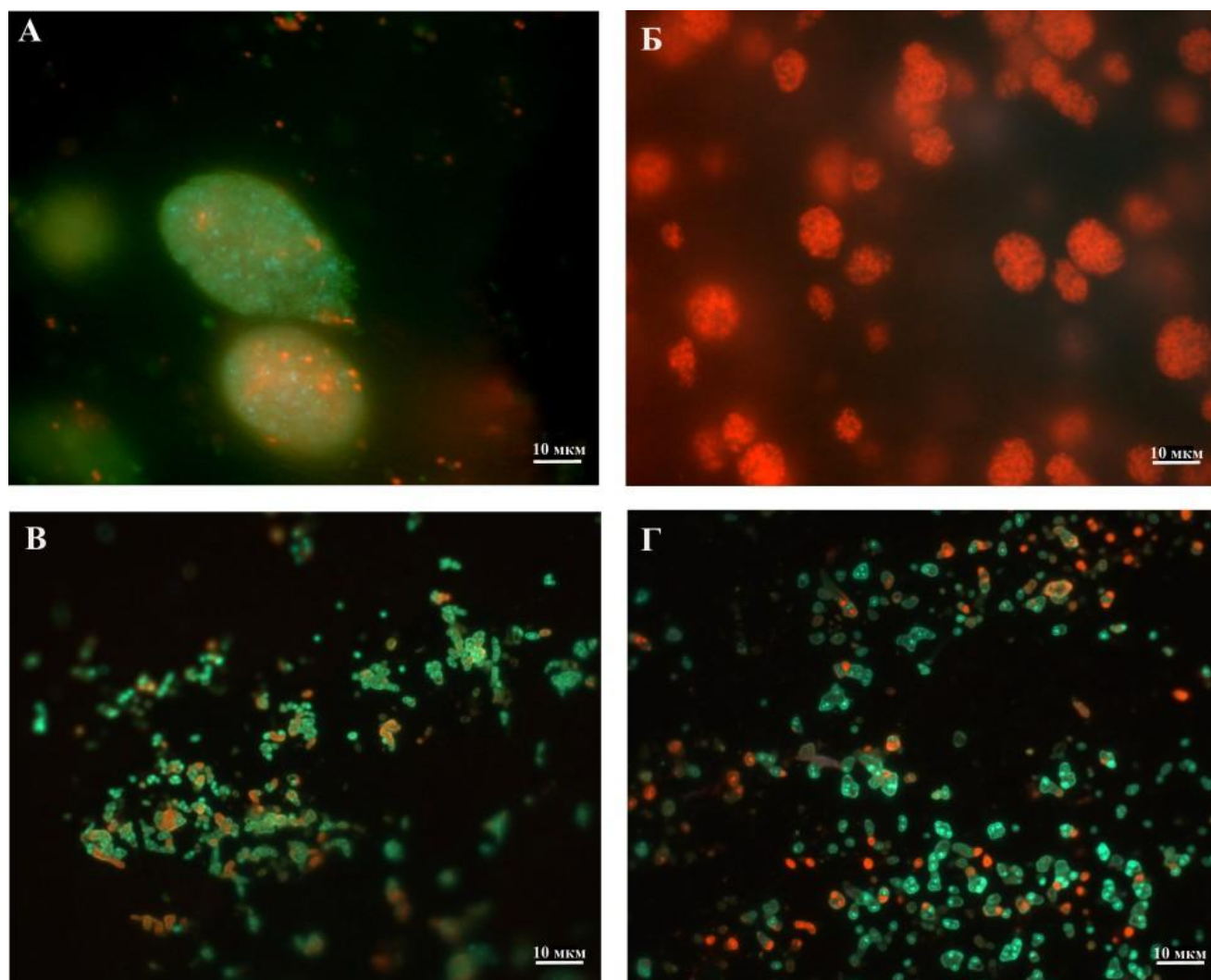


Рисунок 38 – Флуоресцентная микроскопия иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 после 1 (А, В) и 8 (Б, Г) циклов трансформации, окрашенных красителем Live/Dead: А, Б, внешняя поверхность гранулы; В, Г, толща гранулы (Maltseva *et al.*, 2025*)

Приведенные выше данные демонстрируют возможность дальнейшей оптимизации архитектуры носителя с целью минимизации градиентов питательных веществ и увеличения количества циклов эксплуатации иммобилизованного биокатализатора.

Анализ респираторной активности родококков показал, что иммобилизованные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 после 1 цикла

эксплуатации демонстрировали сокращение лаг-фазы роста по сравнению со свободными клетками, как при добавлении (–)-изопулегола, так и без него (Рисунок 39). С увеличением числа циклов биотрансформации лаг-фаза полностью исчезала, а стационарная фаза становилась более продолжительной, что отражалось на графиках скорости и общего объема потребляемого кислорода после 4 цикла. Зафиксированное в это время увеличение на (30%) общего объема потребляемого кислорода 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 в указанных условиях и, как следствие, с повышением их устойчивости к стрессу за счет закрепления в матрице ПВС.

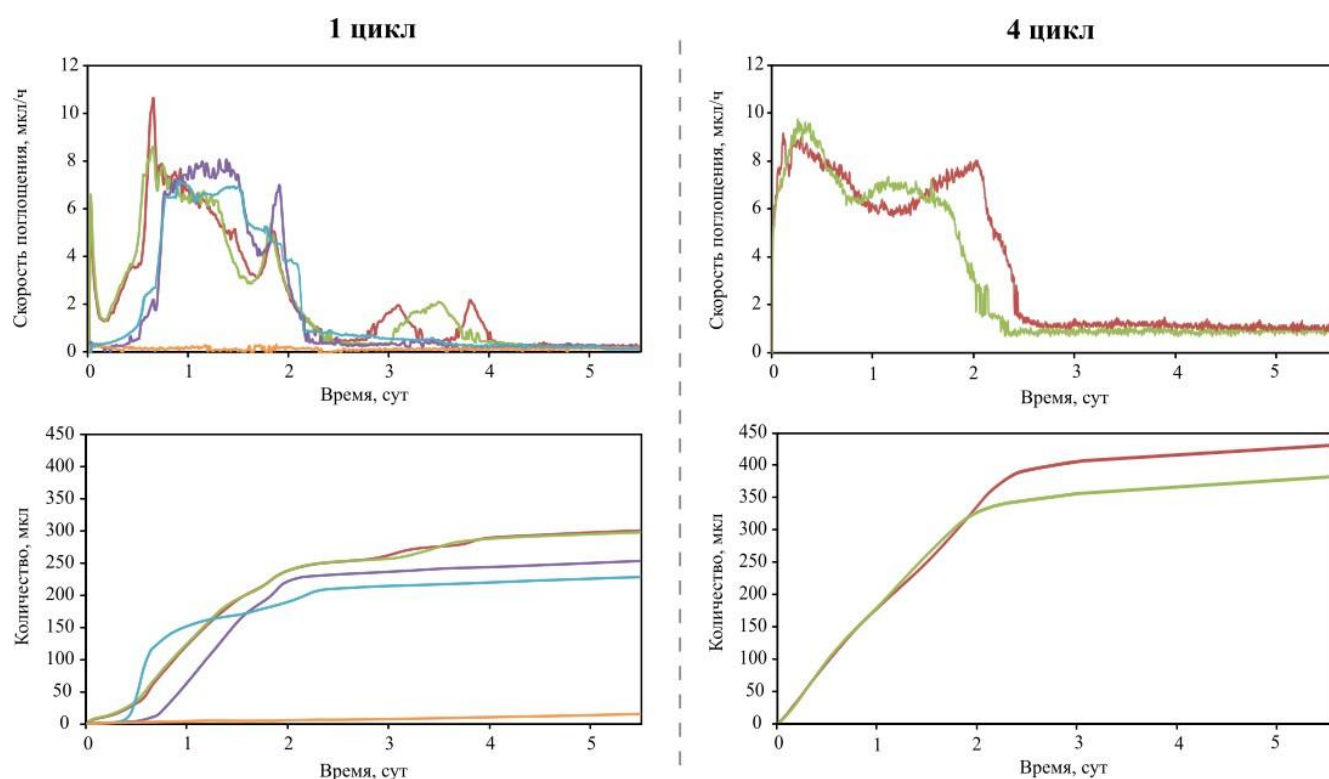


Рисунок 39 – Скорость поглощения и количество потребленного кислорода клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 во время 1 и 4 циклов биотрансформации: —, иммобилизованные клетки с (–)-изопулеголом; —, иммобилизованные клетки; —, свободные клетки с (–)-изопулеголом; —, свободные клетки; —, абиотический контроль (Maltseva *et al.*, 2025*)

Известно, что иммобилизация бактериальных клеток приводит к значительным изменениям их биохимического профиля, аналогичным наблюдаемым в естественных условиях у клеток, входящих в состав биопленок. Иммобилизованные клетки демонстрируют выраженное увеличение концентрации ключевых биомолекул, в том числе полисахаридов, по сравнению со свободными клетками, причём разница может достигать кратных значений (Andryushina *et al.*, 2018). Полисахариды в иммобилизованной системе выполняют роль структурного компонента и фактора адгезии, хотя и в меньшей степени, чем в биопленках (Flemming *et al.*, 2016).

Для изучения адаптивных реакций иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, включая особенности синтеза внеклеточных полимеров и механизмы кворум-сенсинга, было проведено окрашивание флуоресцентным красителем Calcofluor White, специфичным к β -полисахаридам. Микроскопирование окрашенных срезов инокулированных гранул выявило присутствие полисахаридных структур в форме дискретных капель, локализованных на поверхности бактериальных клеток (Рисунок 40). Данный паттерн отличается от организации полисахаридов в биопленках, где они формируют непрерывный слизистый матрикс, обволакивающий клеточные агрегаты.

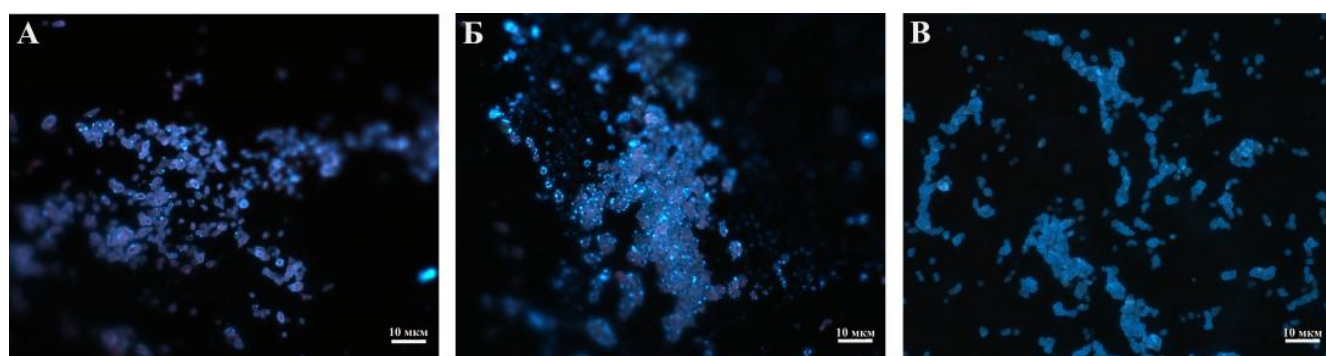


Рисунок 40 – Флуоресцентная микроскопия иммобилизованных (А, Б) и свободных (В) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, окрашенных красителем Calcofluor White: А, иммобилизованные клетки после 1 цикла трансформации; Б, иммобилизованные клетки после 13 циклов трансформации; В, свободные клетки (Maltseva *et al.*, 2025*)

Как видно из Рисунка 40, после 13 циклов эксплуатации в иммобилизованных гранулах наблюдается заметное увеличение количества клеток, секретируемых экзополисахаридами. Это может быть обусловлено адаптацией клеток к повторным циклам использования для защиты от стрессов, связанных с процессом биотрансформации (–)-изопулегола. Кроме того, накопление экзополисахаридов может способствовать повышению стабильности и жизнеспособности иммобилизованных клеток в течение длительного периода эксплуатации.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности применения иммобилизованных в матрице ПВС клеток *R. 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.

Глава 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫЕ В БИОТРАНСФОРМАЦИИ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА

С использованием отдельных клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 выявлено, что окисление (–)-изопулегола обеспечивают ферменты цитоплазматической локализации. Это подтверждается появлением продуктов трансформации на ТСХ (Рисунок 41). Обнаружение внутриклеточной ферментативной активности свидетельствует о вероятном участии цитоплазматических оксидоредуктаз и специфических гидроксилаз, обеспечивающих регио- и стереоспецифическое окисление субстрата. Интересно, что трансформация структурно более сложных терпеновых соединений – тритерпеноида бетулина и дитерпеноида дегидроабиетиновой кислоты – катализируется ферментными комплексами, связанными с клеточной мембраной (Tarasova *et al.*, 2017; Cheremnykh *et al.*, 2018). Подобная закономерность может быть обусловлена особенностями распределения субстратов в бактериальной клетке. Структурно сложные гидрофобные соединения преимущественно накапливаются в мембранных компартментах, где осуществляется их взаимодействие с соответствующими ферментативными системами (Ye *et al.*, 2018). (–)-Изопулегол представляет собой относительно небольшую молекулу с меньшей гидрофобностью по сравнению с ди- и тритерпеноидами и проявляет более низкую токсичность в отношении актиномицетов, что, вероятно, обуславливает его способность проникать в цитоплазму родококков.

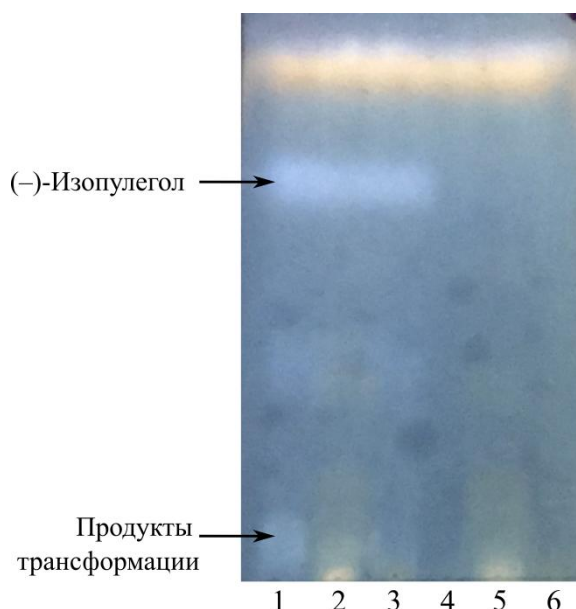


Рисунок 41 – ТСХ (–)-изопuleгола и продуктов его биотрансформации с использованием отдельных клеточных фракций *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362: 1, 4 – цитоплазматические ферменты; 2, 5 – экстрагируемые мембраносвязанные ферменты; 3, 6 – неэкстрагируемые мембраносвязанные ферменты; 4–6 – контроли фракций

По литературным данным, в реакциях микробного окисления монотерпеноидов участвуют цитохром Р450-зависимые оксигеназы, которые локализуются преимущественно в цитоплазме (Zhang *et al.*, 2020). Согласно данным ГХ-МС, введение специфического ингибитора СYP450 метирапона в среду биотрансформации (–)-изопuleгола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 существенно изменяет кинетику процесса (Рисунок 42). При концентрациях метирапона 0,1–0,3 мМ в продуктах реакции преобладает гидроксикислота **78**, однако её выход снижается на 25–60 % относительно контроля без ингибитора. Повышение концентрации метирапона до 0,8 мМ приводит к снижению конверсии субстрата и уменьшению степени окисления продуктов, что выражается в накоплении диола **77**, вероятно, вследствие ингибирования ключевых оксидоредуктаз. Полное подавление биотрансформации (–)-изопuleгола наблюдается при 1 мМ метирапона, что подтверждает участие цитохром Р450-зависимых ферментов в конверсии монотерпеноида.

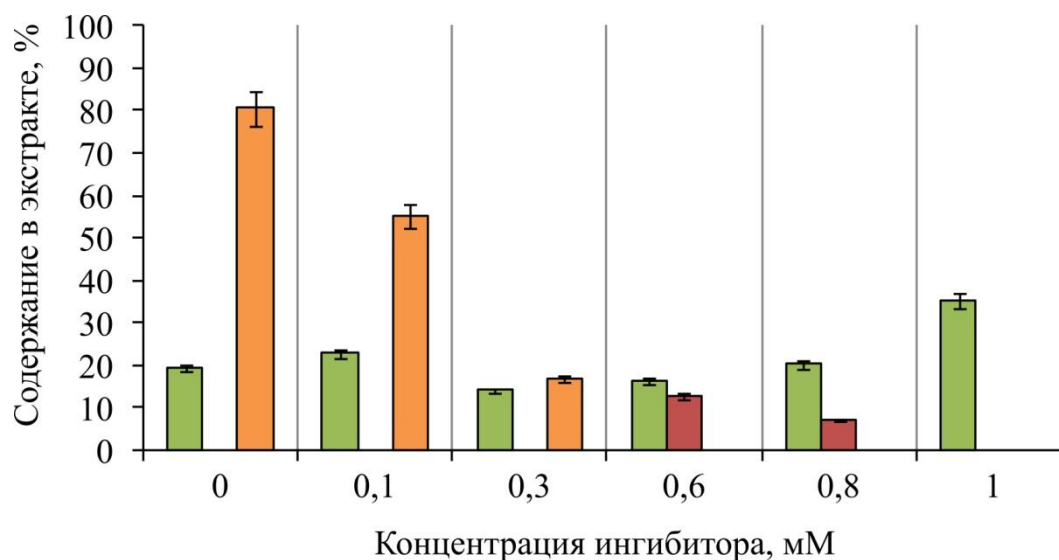


Рисунок 42 – Биотрансформация (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии ингибитора оксигеназ метирапона: ■, (–)-изопулегол; ■, диол 77; ■, гидроксикислота 78 (Maltseva *et al.*, 2025*)

С целью понимания возможных механизмов биотрансформации (–)-изопулегола был секвенирован и аннотирован полный геном штамма-активного биотрансформатора *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Maltseva *et al.*, 2024*).

По данным онлайн-сервиса RAST, размер генома *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 составляет 5,7 Mbp, а содержание GC (гуанин-цитозиновый состав) находится на уровне 67,8 % (Таблица 13).

Таблица 13 – Свойства генома *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Свойство	Значение
Размер, bp	5 733 869
Содержание GC, %	67,8
N50	126 441
L50	13
Количество контигов	145
Количество кодирующих последовательностей	5626
Количество РНК	61

Среди всех кодирующих последовательностей в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 процентное соотношение генов с известной и неизвестной функцией составляло 22:78. Распределение генов с известной функцией по категориям приведено на Рисунке 43.

По результатам анализа метаболических путей в геноме штамма ИЭГМ 1362 детектирован немевалонатный путь биосинтеза изопреноидов, включающий участие следующих ферментов: 1-дезоксид-*D*-ксилоулозо-5-фосфатсинтаза (ЕС 2.2.1.7), 1-дезоксид-*D*-ксилоулозо-5-фосфатредуктоизомеразы (ЕС 1.1.1.267), 2-*C*-метил-*D*-эритритол-4-фосфатцитидилтрансфераза (ЕС 2.7.7.60), 4-дифосфоцитидил-2-*C*-метил-*D*-эритритолкиназа (ЕС 2.7.1.148), 2-*C*-метил-*D*-эритритол 2,4-циклодифосфатсинтаза (ЕС 4.6.1.12), 1-гидрокси-2-метил-2-(*E*)-бутенил-4-дифосфатсинтаза (ЕС 1.17.7.1), 4-гидрокси-3-метилбут-2-енилдифосфатредуктаза (ЕС 1.17.1.2) (Kuzuyama, 2002). Данный путь обеспечивает образование изопентенил дифосфата (IPP) и диметилаллил дифосфата (DMAPP), необходимых для синтеза терпенов, стеролов, каротиноидов, долихолов. В связи с тем, что использованный нами штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 характеризуется ярко-красным окрашиванием колоний (а также клеточных суспензий), скорее всего, обнаруженный путь ответственен за синтез терпеновых каротиноидов. Кроме того, с использованием онлайн-сервиса геномного майнинга AntiSMASH показано наличие в геноме 3-х генных кластеров синтеза терпенов, а также генных кластеров синтеза поликетидов, нерибосомных пептид синтаз, эктоинов, бутиро- и β -лактонов и ϵ -поли-*L*-лизина (Таблица 14).

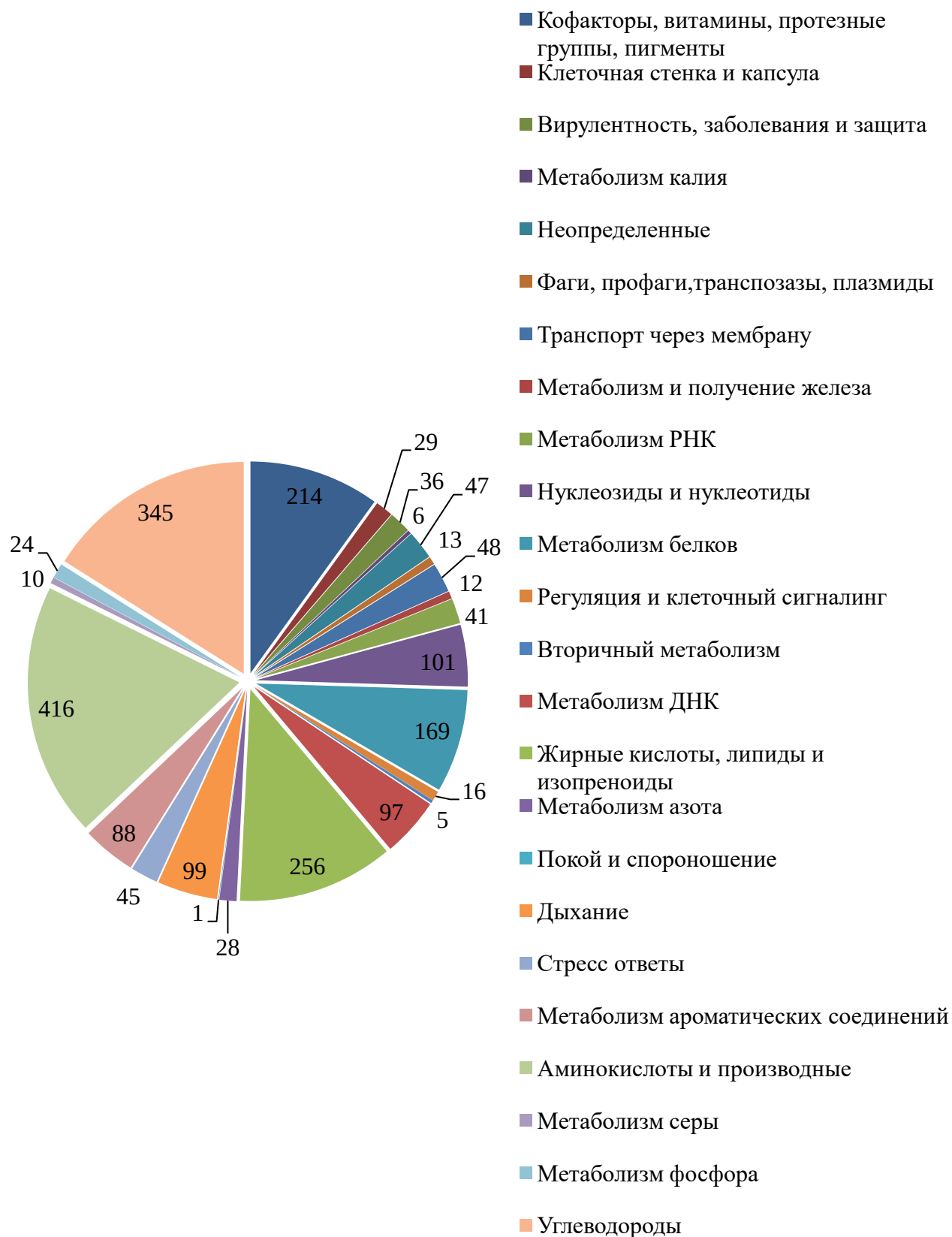


Рисунок 43 – Распределение генов *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 по функциональным группам. Изображение получено с помощью SEED Viewer 2.0 (Maltseva *et al.*, 2024*)

Таблица 14 – Наличие биосинтетических генных кластеров в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Кодируемые элементы	Количество кластеров
Нерибосомальные пептид синтазы	6
Терпены	3
Эктоины	1
β -Лактоны	2
Бутиролактоны	1
ϵ -Поли- <i>L</i> -Лизин	1
Поликетидсинтазы I типа	1

Автоматическое аннотирование полученных последовательностей штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 с использованием сервиса RAST позволило осуществить поиск генов, кодирующих ферменты, предположительно участвующие в бактериальном окислении (–)-изопулегола. Обнаружено 9 генов, кодирующих ферменты семейства цитохром P450 зависимых оксигеназ и гидроксилаз (Таблица 15). Попарное сравнение данных генов внутри штамма в сервисе BLAST показало отсутствие значимых совпадений в режиме Megablast. Это подтверждает тот факт, что все обнаруженные гены являются не копиями, а отдельными функциональными единицами.

Таблица 15 – Гены *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, кодирующие ферменты CYP450

№	Фермент	ID контига	Расположение (размер, пн)
1	Putative cytochrome P450 hydroxylase	NODE_57_length_21710_cov_10.08 3492	20649–18289 (2361)
2	Putative cytochrome P450 hydroxylase	NODE_33_length_49450_cov_11.18 4397	41128–42420 (1293)
3	Cytochrome P450	NODE_17_length_96204_cov_10.94 5325	67773–69119 (1347)
4	Putative cytochrome P450	NODE_54_length_24166_cov_8.603 810	6580–7959 (1380)
5	Cytochrome P450	NODE_2_length_337154_cov_11.64 8399	238563–237184 (1380)

Окончание Таблицы 15

№	Фермент	ID контига	Расположение (размер, пн)
6	Putative cytochrome P450 hydroxylase	NODE_27_length_73775_cov_9.719 571	62892–64214 (1323)
7	Cytochrome P450 monooxygenase	NODE_33_length_49450_cov_11.18 4397	31096–29762 (1335)
8	Cytochrome P450	NODE_2_length_337154_cov_11.64 8399	99355–98144 (1212)
9	Putative cytochrome P450 hydroxylase	NODE_20_length_89047_cov_8.544 141	82615–81383 (1233)

На основе обнаруженных последовательностей с использованием сервиса Primer-BLAST подобраны пары праймеров для отдельных генов, а с использованием ПЦР в реальном времени – оптимальные условия их амплификации, гарантирующие образование продуктов ожидаемого размера без амплификации дополнительных фрагментов ДНК других размеров, характерных для GC-богатых матриц (Таблица 16). Проведение ПЦР с подобранными праймерами подтвердило наличие всех предполагаемых генов в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Рисунок 44).

Таблица 16 – Праймеры к генам *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, кодирующим ферменты CYP450

№ гена	Направление праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	T _{пл} , °C	Размер ампликона, пн
1	Прямой Обратный	TACAGCCCCGAACCTCGACTA TGTCCGGTATCGATGAAGCG	55,7	311
2	Прямой Обратный	GTTCATCGAGGGCCTGAACA CTCGAAACGCAGTGTCTCCT	57	373
3	Прямой Обратный	CGACGACATCTTCTCGGTGT TGTGGTGGGAGAAGTGCATC	59	389
4	Прямой Обратный	TCGTTCGCTTTGCACTACCT CGAATGGCTTGTATGCGTGG	59	370

Окончание Таблицы 16

№ гена	Направление праймера	Последовательность праймера (5' → 3')	T _{пл} , °C	Размер ампликона, пн
5	Прямой Обратный	CACGTCGACCATCACGATCT TTGGTGGACGATCGCTTTGA	61,4	448
6	Прямой Обратный	GCTCTGACGCAGGAGTTCTT ACGCAGTGTGTAGTCCTGTG	61,4	444
7	Прямой Обратный	ATCGGTTACCCAGAACCTG GAGGACAGGATCACGAAGCC	59	403
8	Прямой Обратный	CCGATCTCGTAGCCCAGTTC TTCGCTGATCTCGATTCCCG	61,4	554
9	Прямой Обратный	CATCTCCCACGGCCTGTATC TGTACTIONGACACGAAGGTGC	63,3	461

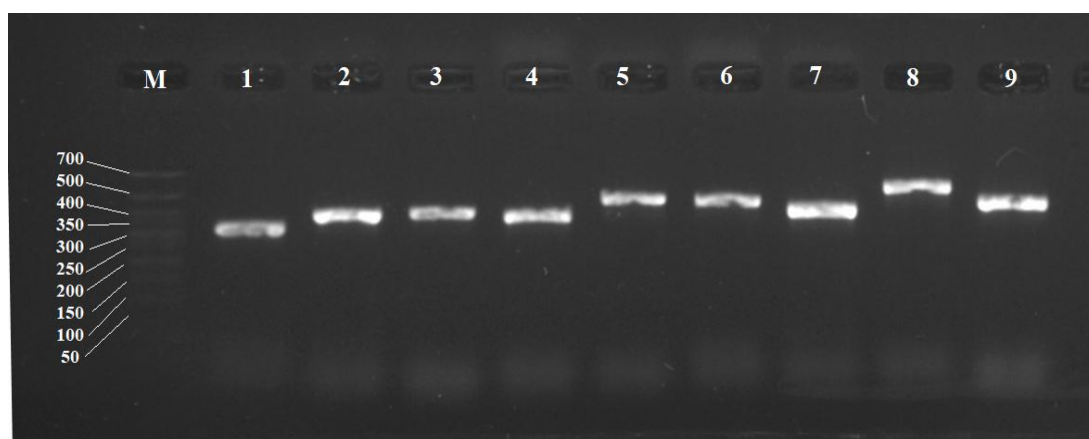


Рисунок 44 – Электрофореграмма продуктов ПЦР *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 со специфическими праймерами к генам CYP450. М – маркер длин ДНК от 700 до 50 п.н. Номера генов (1–9) совпадают с номерами генов в Таблице 16. (Maltseva *et al.*, 2024*)

В настоящее время количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (кПЦР-РВ) признана «золотым стандартом» для оценки экспрессии бактериальных генов (Rocha *et al.*, 2020). Важнейшим этапом данного метода является подбор референсных генов, обладающих стабильным уровнем экспрессии при различных условиях культивирования. Для родококков в качестве

референсных используются гены, кодирующие ферменты, участвующие в поддержании структуры и репликации ДНК, транскрипции, трансляции и регуляции белкового обмена. Несмотря на широкое использование так называемых «генов домашнего хозяйства», их стабильность необходимо подтверждать экспериментально для каждой конкретной исследовательской задачи (Rocha *et al.*, 2015). Например, экспрессия гена рекомбиназы A (*recA*) у родококков оставалась неизменной при деградации эстрогенов (Tian *et al.*, 2020), однако значительно повышалась в условиях метаболизма углеводов, что связано с клеточным ответом на присутствие субстрата и ограничивает применение этого гена в качестве референсного (Sazykin *et al.*, 2019). Наиболее часто используемым референсным является ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК, однако менее 25% исследований подтверждают его пригодность, что объясняется высокой вариабельностью его экспрессии в различных экспериментальных условиях (Rocha *et al.*, 2020).

На основании литературных данных нами были отобраны шесть кандидатов референсных генов, к ним были подобраны специфические праймеры для *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 (Таблица 17) и оптимальные условия амплификации. В результате ПЦР генов-кандидатов, были получены продукты ожидаемого размера для каждой пары праймеров, без образования неспецифических продуктов или димеров праймеров, а кривые плавления для каждой пары праймеров были унимодальными. Эффективность амплификации референсных генов-кандидатов составляла от 88,9 до 98,9 %, а коэффициенты корреляции (R^2) от 0,914 до 0,998, что соответствует требованиям для кПЦР (Bustin *et al.*, 2009).

Таблица 17 – Специфические праймеры к референсным генам *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

Ген	Аннотация	Праймеры (прямой; обратный)	Размер ампликона, пн	Эффективность ПЦР, %	R ²
<i>16S rRNA</i>	16S рибосомальная РНК	GAGGGGTGGAAAGTTTTTCGGTGCAGGATGA; AGCCATGCACCACCTGTCTACCGG	839	98,9	0,995
<i>gyrA</i>	ДНК гираза, α -субъединица	CGATGTTCGACAACGGCTTC; TGATGAGGTTGTCCGGGTTG	681	97,8	0,914
<i>gyrB</i>	ДНК гираза, β -субъединица	GCGGCAAGATCATCAACGTC; TCCTTGCGTTTCATCTCACC	415	90,4	0,998
<i>ftsZ</i>	Белок клеточного деления	GATCGAGCAGGGACTCAAGG; GTCGTTGGGGATGACGATGA	412	90,5	0,992
<i>secA</i>	Белковая транслоказа, α –субъединица	CACCGTCATCTACGAGGAGC; CCGACCGATTCTCCTTCAG	513	97,8	0,994
<i>dnaG</i>	ДНК праймаза	TACGATCCGCGACAACCTACG; GTTCCATCACGAGCGAATGC	419	88,9	0,994

Далее нами была проведена оценка экспрессии шести генов-кандидатов на роль референсных (*16S rRNA*, *gyrA*, *ftsZ*, *gyrB*, *dnaG*, *secA*) с целью выбора наиболее стабильных для нормализации данных кПЦР (Maltseva *et al.*, 2025*). Для анализа использовали кДНК клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, выращенных в четырех различных условиях: (1) в среде RS; (2) в среде RS с добавлением (–)-изопулегола; в среде LB; (4) в среде LB с добавлением (–)-изопулегола.

На Рисунке 45 представлено распределение значений пороговых циклов *Ct* (cycle threshold) для каждого из анализируемых генов. *Ct* определяется как количество циклов ПЦР, необходимое для достижения уровня флуоресценции, который достоверно отличается от фонового сигнала (Rocha *et al.*, 2020). Показатель *Ct* обратно коррелирует с исходной концентрацией ДНК, что позволяет осуществлять количественную оценку содержания целевой матрицы в образце. Ген *16S rRNA* характеризовался наиболее низкими значениями *Ct* (от 5 до 14), что свидетельствует о его высокой экспрессии во всех исследованных образцах. Однако столь высокий уровень экспрессии может привести к снижению чувствительности при нормализации низкоэкспрессируемых генов, таких как цитохромы, что ограничивает возможность использования *16S rRNA* в качестве референсного гена в рамках нашего исследования. Гены *gyrA*, *ftsZ* и *secA* демонстрировали схожий уровень экспрессии, с *Ct* в диапазоне 27–34. При этом для *gyrA* и *secA* отмечалась большая вариабельность значений *Ct* по сравнению с *ftsZ*, что может указывать на меньшую стабильность их экспрессии в различных условиях эксперимента. Ген *dnaG* отличался самыми высокими значениями *Ct* (от 34 до 38), что указывает на крайне низкий уровень его экспрессии и потенциальную нестабильность при использовании в качестве референсного гена. Особый интерес представляют результаты, полученные для гена *gyrB*: значения *Ct* для него находились в диапазоне от 24 до 27 при минимальной вариабельности между образцами. Такое сочетание умеренного уровня экспрессии и высокой стабильности позволяет рассматривать *gyrB* как оптимального кандидата для нормализации данных кПЦР.

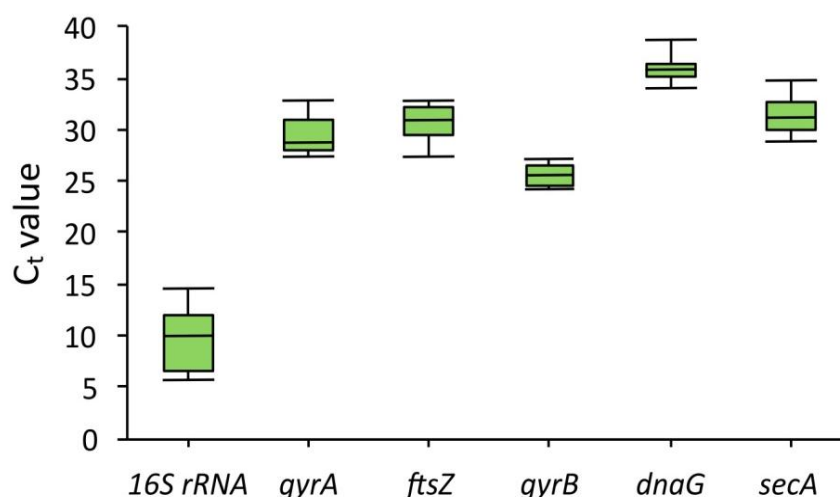


Рисунок 45 – Распределение значений C_t для референсных генов-кандидатов (Maltseva *et al.*, 2025*)

Для выбора оптимальных референсных генов была также проведена комплексная оценка стабильности экспрессии генов-кандидатов на основе значений C_t с использованием пяти различных алгоритмов: BestKeeper, Normfinder, geNorm, Delta CT и RefFinder (Comprehensive ranking). Результаты были сведены в единую таблицу, представленную в виде тепловой карты (Рисунок 46). Числовые значения в ячейках отражают показатели стабильности, полученные для каждого гена соответствующим алгоритмом. Анализ полученной тепловой карты показал, что наибольшей стабильностью при использовании большинства алгоритмов обладает ген *gyrB*, что подтверждает его пригодность в качестве референсного гена для нормализации данных кПЦР. Гены *secA* и *gyrA* также могут рассматриваться в качестве альтернативных референсных генов, поскольку по большинству алгоритмов они занимают промежуточные позиции по стабильности. В то же время гены *dnaG* и, особенно *16S rRNA*, характеризуются наибольшей вариабельностью экспрессии, что делает их использование для нормализации нецелесообразным.

Таким образом, основываясь на результатах комплексной оценки, в качестве оптимальных референсных генов нами были выбраны гены *gyrB* и *secA*. Помимо высокой стабильности в исследованных условиях культивирования, комбинация *gyrB* и *secA* обеспечивает покрытие двух различных функциональных категорий (репликация ДНК и транспорт белков), что снижает риск координированной

регуляции этих генов.

	Comprehensive ranking	NormFinder	DeltaCT	GeNorm	BestKeeper
<i>gyrB</i>	1,86	1,16	8,71	3,60	8,64
<i>secA</i>	2,51	5,71	9,14	2,61	10,57
<i>gyrA</i>	2,99	1,92	9,65	6,78	7,33
<i>ftsZ</i>	3,22	3,94	9,55	6,24	7,46
<i>dnaG</i>	3,50	8,30	10,23	2,61	12,08
<i>16S rRNA</i>	3,83	19,65	20,21	11,26	6,74

Рисунок 46 – Тепловая карта стабильности экспрессии референсных генов-кандидатов. Зеленый цвет соответствует наибольшей стабильности экспрессии, желтый – средней, красный – наименьшей (Maltseva *et al.*, 2025*)

Для оценки роли выявленных генов цитохромов P450 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в биотрансформации (–)-изопулегола мы провели анализ уровня их экспрессии в минерально-солевой среде RS с добавлением и без (–)-изопулегола (Maltseva *et al.*, 2025*). Для нормализации результатов использовали гены *gyrB* и *secA*, в качестве контроля использовали среду RS без добавления монотерпеноида. Уровни экспрессии генов CYP450 представлены на Рисунке 47, номера генов соответствуют Таблице 16.

Гены № 2, 4 и 7 демонстрировали схожий уровень экспрессии во всех исследованных условиях, без выраженной индукции (–)-изопулеголом. Экспрессия генов № 1 и 3 незначительно снижалась в присутствии монотерпеноида. Это может свидетельствовать о том, что данные ферменты либо выполняют вспомогательные функции в трансформации, либо участвуют в более широких процессах метаболизма, не связанных специфически с (–)-изопулеголом.

Гены № 5 и № 8, несмотря на экспериментально подтвержденное присутствие в геноме *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, не экспрессировались ни в одном из условий культивирования. Это может указывать на то, что данные гены либо активируются при других условиях роста, либо представляют собой псевдогены или гены, находящиеся под контролем специфических регуляторных систем, не активированных в данном эксперименте.

Экспрессия гена № 9 была зафиксирована только в отсутствии (–)-изопулегола, что может свидетельствовать о подавлении альтернативных метаболических путей в процессе трансформации монотерпеноида. Такой паттерн экспрессии указывает на возможное участие данного гена в катаболизме других субстратов, которые становятся менее приоритетными в присутствии (–)-изопулегола в среде.

Ген № 6 демонстрировал высокий уровень экспрессии в присутствии (–)-изопулегола, в 16 раз превышающий контрольные значения, что говорит о его непосредственном участии в метаболизме данного субстрата. Такие данные подкрепляют предположение о том, что продукт гена № 6 кодирует ключевой цитохром P450, ответственный за специфическое гидроксилирование (–)-изопулегола.

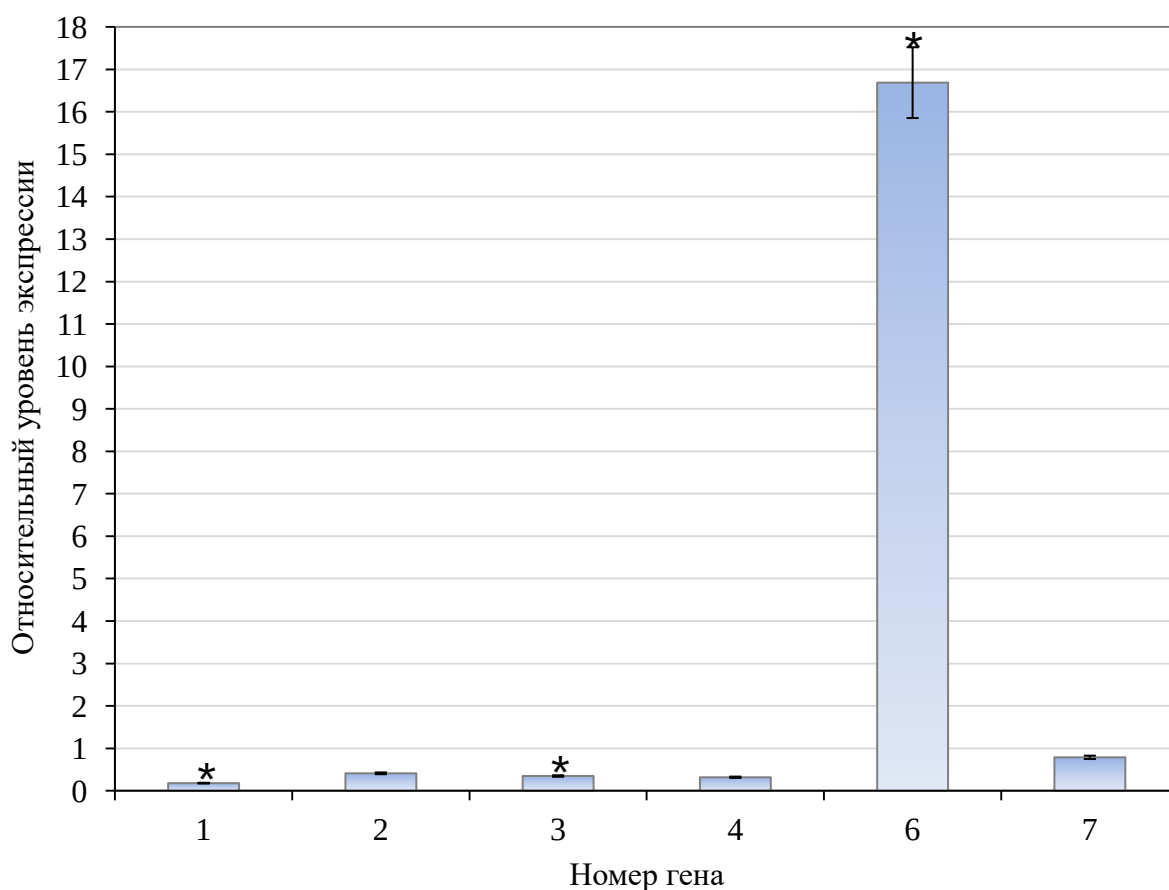


Рисунок 47 – Относительный уровень экспрессии генов CYP450 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 в присутствии (–)-изопулегола. *Данные являются статистически достоверными ($p\text{-value} < 0,05$) (Maltseva *et al.*, 2025)

Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают, что из составленной библиотеки генов цитохромов P450 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 именно ген № 6 играет ключевую роль в биотрансформации (–)-изопулегола, поскольку его экспрессия значительно и строго индуцируется присутствием данного субстрата. Другие гены, судя по профилям экспрессии, скорее всего, выполняют вспомогательные функции в метаболическом процессе или участвуют в трансформации альтернативных соединений.

Анализ генетического окружения генов CYP450 (Таблица 18) позволил выявить белки-партнеры цитохромов – ферредоксин и ферредоксинредуктазу – в непосредственной близости CYP450 № 6. Можно предположить, что гены, кодирующие CYP450 № 6, ферредоксин и ферредоксинредуктазу, представляют собой единый генный кластер, экспрессируемый в виде полицистронного транскрипта, и отвечают за отдельный метаболический процесс, вероятно, за превращение (–)-изопулегола. Кроме того, в окружении гена № 6 присутствует мобильный элемент, что позволяет предположить возможность горизонтального переноса данного гена среди штаммов *Rhodococcus* spp.

Таблица 18 – Генетическое окружение генов, кодирующих ферменты CYP450 *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362

№ гена	Близлежащие гены			
	Вышестоящие регуляторы транскрипции	Белки, принимающие участие в переносе электронов и редокс-реакциях	Мобильные элементы и транспозазы	Другое
1	<i>IclR</i>	—	—	Транспортер L-пролина/глицин-бетаина ProP; эноил-КоА-гидратаза; предполагаемая гидролаза/ацилтрансфераза
2	<i>MarR</i>	Ген CYP450 № 7; оксидоредуктаза, короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза	—	2 MFS-транспортера
3	<i>IclR</i>	ТТР-зависимый белок, связанный с E1 компонентом пирувата/2- оксоглутарат/ацетоин дегидрогеназа; тиоредоксинредуктаза; 2 ацил-КоА-дегидрогеназы	—	Предполагаемая гидролаза; 2 фторионных транспортера CrcB; пермеаза и транслокационный белок для аминокислот; ферменты для синтеза липидов и жирных кислот
4	<i>XRE</i>	—	1 мобильный элемент	Предполагаемая пептидаза; предполагаемый трансмембранный белок
5	<i>AcrR</i>	4-Гидрокси-фенилпируват-диоксигеназа; алкогольдегидрогеназа; 2 ацил-КоА-дегидрогеназы; предполагаемая короткоцепочечная дегидрогеназа	—	Другие транскрипционные регуляторы; 2 метилированные ДНК-цистеин метилтрансферазы; сигма фактор РНК-полимеразы RpoE; ДНК-3-метиладенин гликозилаза II; ДНК-полимераза I

Окончание Таблицы 18

№ гена	Близлежащие гены			
	Вышестоящие регуляторы транскрипции	Белки, принимающие участие в переносе электронов и редокс-реакциях	Мобильные элементы и транспозазы	Другое
6	—	Ферредоксин, 2Fe-2S; ферредоксин редуктаза; алкогольдегидрогеназа; сукцинато-полуальдегид дегидрогеназа [НАД] [НАДФ+]	1 мобильный элемент	Ферменты синтеза липидов и жирных кислот
7	<i>AcrR</i>	Оксидоредуктаза, короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза; ген CYP450 № 1; предполагаемая диоксигеназа	—	2 Пептидазы; КоА-лигаза длинноцепочечных жирных кислот; предполагаемая эстераза
8	<i>AraC</i>	1,2-Дигидроксициклогекса-3,5-диен-1-карбоксилат дегидрогеназа; ФАД-связывающий домен оксидоредуктаз; альфа и бета субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы; 2- полипренилфенол гидроксилаза; 4- гидроксифенилацетат 3-монооксигеназа; НАДФ-ФМН оксидоредуктаза; катехол 1,2-диоксигеназа	—	2 транспортера бензоата; другие транскрипционные регуляторы; муконациклоизомераза; муконлактонизомераза
9	<i>TetR</i>	Три оксидоредуктазы, короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза; 3-оксостероид 1-дегидрогеназа	1 мобильный элемент	Изохоризматаза; эноил-КоА-гидратаза; консервативный белок, ассоциированный с ацетил-КоА С-ацилтрансферазой

С целью более детального изучения генетических механизмов, лежащих в основе трансформации (–)-изопулегола родококками, был проведён молекулярно-генетический анализ ещё одного штамма, характеризующегося высокой каталитической активностью, – *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (Plotnitskaya *et al.*, 2025*). Штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 способен к трансформации дитерпеноида дегидроабиетиновой кислоты (Ivanova *et al.*, 2022), монотерпеноидов (–)-*транс*-карвеола (Мальцева *и др.*, 2024) и (–)-изопулегола.

С помощью сервиса RAST в геноме штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 обнаружено 9 генов, кодирующих ферменты семейства цитохромов P450, нуклеотидные последовательности которых на 100% идентичны последовательностям генов штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362. Учитывая данную консервативность, мы провели ПЦР с праймерами, разработанными для генов штамма ИЭГМ 1362. Результаты амплификации подтвердили наличие соответствующих генов в геноме ИЭГМ 107 и отсутствие неспецифических продуктов (Рисунок 48).

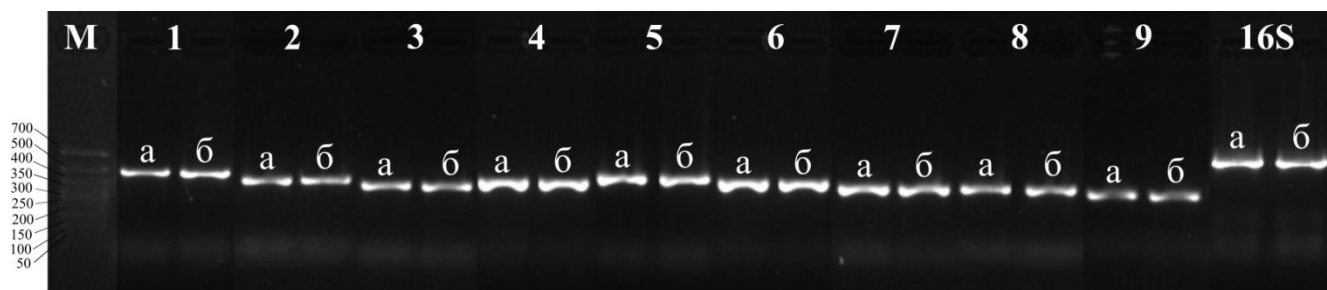


Рисунок 48 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (а) и ИЭГМ 1362 (б) со специфическими праймерами для генов CYP450: М, маркер длины ДНК от 700 до 50 п.н.; 16S, ген 16S рРНК *R. rhodochrous* (положительный контроль). Номера генов (1–9) совпадают с номерами генов в Таблице 16.

Для оценки уровня экспрессии генов, кодирующих CYP450 в клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, был использован метод цифровой ПЦР, одним из преимуществ которой является возможность достижения беспрецедентной точности результатов и получения абсолютных значений концентраций нуклеиновых кислот без использования калибровочных кривых. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, приведены в

Таблице 19. Последовательности зондов были модифицированы флуорофором FAM на 5'-конце и гасителем BHQ-1 на 3'-конце.

Таблица 19 – Праймеры и зонды к генам *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, кодирующим ферменты CYP450

№ гена	Последовательность праймеров (прямой, обратный)	Последовательность зонда
1	CCCCGTCGACCACATCGC; CAACGCAGAGACGCGGCC	CCGGCTGCCCCGTCTCCCCG
2	CGGGATGCCCGGTCACG; CGGTCACCGAGATGCACGA	GGCGATCCAGGTCCTGAGCG
3	GACGAAGATGCTCGCTCCC; TGCGTATACGCCGCAACGG	TCGCTCCCGTCCCCGGCGACAA
4	TTGCTGGGCGATGTGTTGCG; CACGATGACCTTGCGACCGA	GCGACCGGTGCAGCGGGAAGC
5	GATCCCCTCGCGATGATGCA; CAGCACCTCCTGGCAGGC	CCGCTACGGCGAGGTCTCCTGCT
6	CTGTGGCTCGTGAGCAAGCA; GGCCTGATTTGCCAGGATCG	GGAGATCGAGCGCCAGCCCGACA
7	CGACTCCTCGGGCAGGTG; GATCAGGCGGACCACGCC	GGCGGTGGGACCGATCGCTCGT
8	GCGCCGAAGCTCCGATCG; CGGCGGGGGTGATGATGC	CTCGGCGCCTACGTGGCGTCCA
9	ACGAGATGCCGCATGGTGG; CCTCGAGGATGAACGCCTC	TCCGCCTTTGCGTCGCTGGTGCC

Анализ результатов цифровой ПЦР (Рисунок 49) подтвердил значительное повышение уровня экспрессии гена № 6 в клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии (–)-изопулегола. Внесение монотерпеноида также индуцировало увеличение экспрессии других генов семейства CYP450, за исключением генов № 1 и № 8. Полученные данные позволяют предположить, что ген № 6 играет ключевую роль в биотрансформации (–)-изопулегола, однако нельзя исключать участие и других функциональных генов в данном метаболическом процессе.

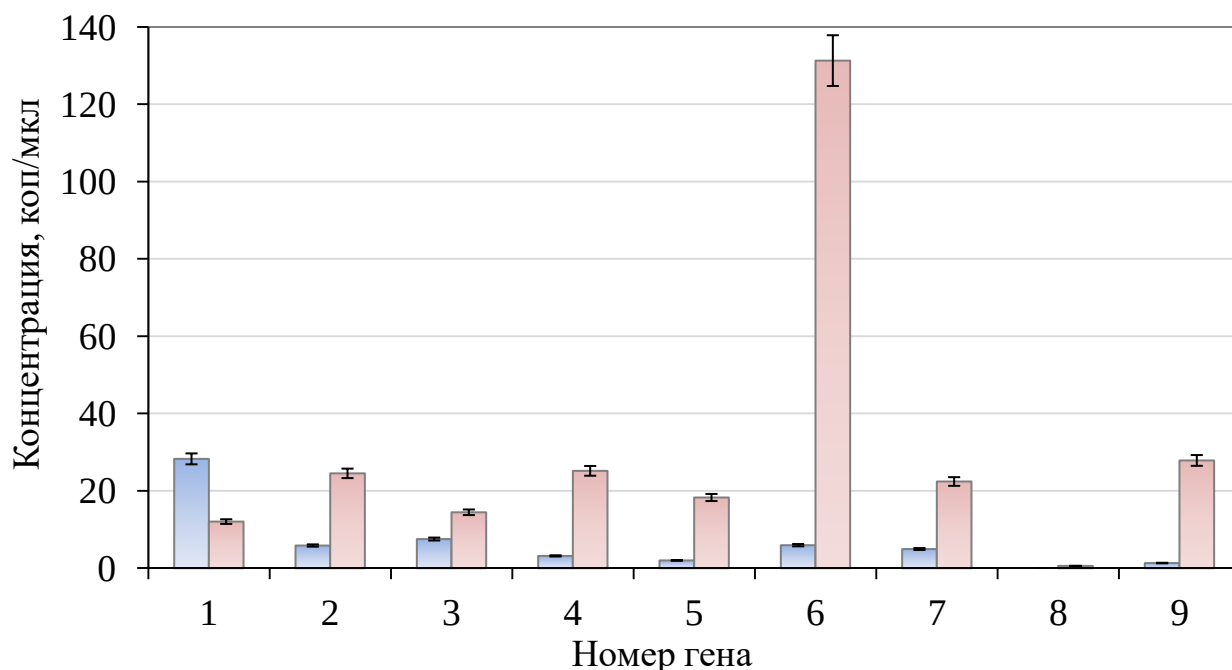


Рисунок 49 – Уровень экспрессии генов CYP450 в клетках *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии (■) и без (□) (–)-изопулегола

Попарное выравнивание аминокислотной последовательности гена № 6 с известными последовательностями CYP450, представленных в базе данных UniProt, позволило нам идентифицировать гомологичные последовательности с уровнем идентичности до 94,3% (Таблица 20). Наибольшее сходство наблюдалось с последовательностями представителей рода *Rhodococcus*, а также близкородственных родов *Nocardia* и *Gordonia*. Тем не менее, уровень идентичности CYP450 № 6 с ранее охарактеризованными цитохромами P450 остается относительно низким, что подчеркивает новизну выявленного фермента и актуальность его дальнейшей идентификации и функциональной характеристики.

Полученные результаты расширяют понимание молекулярно-генетических механизмов биотрансформации монотерпеноидов и создают основу для возможного дальнейшего направленного мутагенеза функциональных генов (делеция, гетерологичная экспрессия, гиперэкспрессия) с целью подтверждения роли функционального гена № 6 в бактериальной трансформации (–)-изопулегола и повышения уровня его экспрессии.

Таблица 20 – Попарное выравнивание аминокислотной последовательности гена № 6 с известными последовательностями CYP450

Название белка	Организм	Длина, АА	Идентичность, %
Cytochrome P450	<i>Rhodococcus</i> sp. CX	440	94,3
Cytochrome P450-terp	<i>Rhodococcus</i> sp. T7	440	92,3
Cytochrome P450	<i>Rhodococcus oxybenzonivorans</i>	440	91,1
Cytochrome P450-terp	<i>Nocardia cerradoensis</i>	440	85,6
Putative cytochrome P450	<i>Gordonia aichiensis</i> NBRC 108223	443	77,9
Cytochrome P450	<i>Gordonia asplenii</i>	442	77,2
Cytochrome P450	<i>Gordonia desulfuricans</i>	443	77
Cytochrome P450-terp	<i>Gordonia insulae</i>	441	76,8
Cytochrome P450	<i>Nocardia jinanensis</i>	443	76,5
Cytochrome P450	<i>Amycolatopsis acidiphila</i>	441	71,2
Linalool 8-monooxygenase	<i>Candidatus Protofrankia datiscae</i>	441	70,6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время остро стоит проблема дефицита высокоэффективных фармакологических средств для лечения социально значимых заболеваний. Одним из активно развивающихся направлений в области фармакологии является синтез соединений с выраженным фармакологическим эффектом на основе доступного и дешевого сырья – растительных полициклических терпеноидов. Среди них в качестве исходного соединения в синтезе новых биоактивных веществ значительный интерес представляет монотерпеновый спирт (–)-изопулегол (Minh Le, Szakonyi, 2022). В отличие от химического синтеза, бактериальная трансформация позволяет проводить модификацию молекул исходных веществ с высокой степенью стерео- и региоселективности с образованием биодоступных и биоактивных производных в одну технологическую стадию и при экологически безопасных условиях. Следует отметить, что сведения о микробной трансформации (–)-изопулегола до сих пор остаются крайне фрагментарными и ограничены единичными исследованиями, посвященными использованию ферментов мицелиальных грибов (Su *et al.*, 2020) и сообщением о способности родококков использовать данный монотерпеноид в качестве источника углерода (Shukla *et al.*, 1987). В связи с этим актуален поиск новых эффективных биокатализаторов для получения производных (–)-изопулегола с выраженной биологической активностью. Одной из наиболее активно разрабатываемых групп в современной биотехнологии являются непатогенные актиномицеты экологически значимых видов, характеризующиеся наибольшим разнообразием трансформируемых сложных гидрофобных соединений.

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 – (1R,2S,5R)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола и (1R,3R,4S)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-

ил)циклогексанкарбоксильной кислоты. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 с наибольшей каталитической активностью в отношении данного монотерпеноида. Аналоги идентифицированных соединений ранее были получены при трансформации ментола и его производных мицелиальными грибами и грамотрицательными бактериями (Sawamura *et al.*, 1976; Asakawa *et al.*, 1991; Sassa *et al.*, 2003). 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 морфофизиологические особенности иммобилизованных бактериальных клеток. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения иммобилизованных в матрице 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 СУР450 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 СУР450 и изучено их генетическое окружение. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и цифровой ПЦР выявлено индуцированное присутствием (–)-изопулегола повышение экспрессии гена, кодирующего цитохром Р450 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 гидроксипроизводных.

2. Установлено, что продуктами биотрансформации (–)-изопулегола клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 являются (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанол и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидроксип-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 (1*R*,2*S*,5*R*)-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 СYP450-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 СОКРАЩЕНИЙ

АСМ-КЛСМ – атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ-МС – газовая хромато-масс спектрометрия

кДНК – комплементарная ДНК

кПЦР-РВ – количественная ПЦР в реальном времени

ЛД₅₀ – средняя летальная доза

МПБ – мясопептонный бульон

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НГ – нанотрубки галлуазита

ОП – оптическая плотность

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

ПВС – поливиниловый спирт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РСА – рентгеноструктурный анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТСХ – тонкослойная хроматография

цПЦР – цифровая ПЦР

ЭД₅₀ – средняя эффективная доза

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектрометрия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

CYP450 – cytochrome P450

ECOSAR – Ecological Structure Activity Relationships

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

INT – йодонитротетразолия хлорид

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NGS – next generation sequencing

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances

R. – *Rhodococcus*

RAST – Rapid Annotation using Subsystem Technology

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герлинг Н.В., Пунегов В.В., Груздев И.В. Компонентный состав эфирного масла можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis* L.) под пологом елового древостоя на европейском северо-востоке России // Химия растительного сырья. – 2016. – № 2. – С. 89–96.
2. Ившина И.Б. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов в России // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 551–560.
3. Мальцева П.Ю. и др. Поиск штаммов родококков - активных биотрансформаторов монотерпеноидов // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2024. – Т. 16. – С. 351–360.
4. Мухаматханова Р.Ф. и др. Терпеноиды и другие компоненты *Artemisia sogdiana* и *A. serotina*, произрастающих в Узбекистан // Химия растительного сырья. – 2017. – № 2. – С. 133–136.
5. Племенков В.В. Химия зопреноидов // Химия растительного сырья. – 2006. – № 2. – С. 63–87.
6. Препаративная химия терпеноидов: в 3 ч. / К.П. Волчо, Л.Н. Рогоза, Н.Ф. Салахутдинов и др.; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Новосиб. ин-т орган. химии им. Н. Н. Ворожцова. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2005. – Ч. 1: Бициклические монотерпеноиды. – 265 с.
7. Романова М.Г., Бузук А.Г. Химический состав эфирных масел трех видов многоколосников (*Agastache*) // Вестник фармации. – 2020. – Т. 1, № 87. – С. 8–10.
8. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений // Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 664 с.
9. Abbas M.M., Kandil Y.İ., Abbas M.A. R-(–)-carvone attenuated doxorubicin induced cardiotoxicity *in vivo* and potentiated its anticancer toxicity *in vitro* // Balkan Medical Journal. – 2020. – Vol. 37, No 2. – P. 98–103.
10. Akobirshoeva A., Olennikov D.N. Chemical composition of the essential oil of *Ziziphora pamirolaica* lam. (*Lamiaceae*) growing in Tajikistan // Khimiya

Rastitel'nogo Syr'ya. – 2017. – No 1. – P. 51–58.

11. Allenspach M., Steuer C. α -Pinene: A never-ending story // *Phytochemistry*. – 2021. – Vol. 190. – P. 112857.
12. Alvarez H.M., Mayer F., Fabritius D. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630 // 1996. – P. 377–386.
13. Alves D. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium // 2018. – P. 1–8.
14. Amirmohammadi F.Z. et al. Analysis of the essential oil composition of three cultivated *Nepeta* species from Iran // *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. – 2020. – Vol. 75, No 7. – P. 247–254.
15. Andryushina V.A. et al. Immobilized cells: biocatalysts and processes // Publishing Center RIOR, Moscow. – 2018. – 500 p.
16. Angel G.R. et al. Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species // *Industrial Crops and Products*. – 2014. – Vol. 60. – P. 233–238.
17. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–15.
18. Asakawa Y. et al. Biotransformation of monoterpenoids, (–)- and menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30, No 12. – P. 3981–3987.
19. Aziz R.K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9, No 75. – P. 1–15.
20. Bakkali F. et al. Biological effects of essential oils - A review // *Food and Chemical Toxicology*. – 2008. – Vol. 46, No 2. – P. 446–475.
21. Bamou F.Z. Antiproliferative activity of (–)-isopulegol-based 1,3-Oxazine, 1,3-thiazine and 2,4-diaminopyrimidine derivatives // *ChemistryOpen*. – 2022. – Vol. 11. – Art. e202200169.
22. Baranauskaite J. et al. The Influence of Different Oregano Species on the Antioxidant Activity Determined Using HPLC Postcolumn DPPH Method and Anticancer Activity of Carvacrol and Rosmarinic Acid // 2017. – Art. 1681392.
23. Barbirato F. et al. The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-

epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 438, No 3. – P. 293–296.

24. Benítez-Mateos A.I. et al. Design of the enzyme-carrier interface to overcome the O₂ and NADH mass transfer limitations of an immobilized flavin oxidase // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2020. – Vol. 12, No 50. – P. 56027–56038.

25. Bicas J.L. et al. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 105. – P. 1991–2001.

26. Bisht M. et al. Biomass-derived functional materials as carriers for enzymes: towards sustainable and robust biocatalysts // Green Chemistry. – 2023. – Vol. 25, No 12. – P. 4591–4624.

27. Blin K. et al. AntiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49. – P. W29–W35.

28. Blombach B. et al. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production // 2011. – Vol. 77, No 10. – P. 3300–3310.

29. Bommareddy R.R. et al. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase // Metabolic Engineering. – 2014. – Vol. 25. – P. 30–37.

30. Bounihi A. et al. *In vivo* potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil // Advances in Pharmacological Sciences. – 2013. – Art. 101759.

31. Bradley J.M. et al. Bacterial iron detoxification at the molecular level // Journal of Biological Chemistry. – 2020. – Vol. 295, No 51. – P. 17602–17623.

32. Brodkorb D. et al. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes // The Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285, No 40. – P. 30436–30442.

33. Busch H., Hagedoorn P.L., Hanefeld U. *Rhodococcus* as a versatile biocatalyst in organic synthesis // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, No 19. – P. 1–36.

34. Buschke N., Schroder H., Wittmann C. Metabolic engineering of

Corynebacterium glutamicum for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose // Biotechnology Journal. – 2011. – Vol. 6. – P. 306–317.

35. Bustin S.A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55, No 4. – P. 611–622.

36. Cadwaluder K.R., Braddock R.J., Parish M.E. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli* // Journal of Food Science. – 1989. – Vol. 54, No 5. – P. 1241–1245.

37. Calixto J.B. The role of natural products in modern drug discovery // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. – 2019. – Vol. 91. – Art. e20190105.

38. Caputo L. et al. *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities // Molecules. – 2017. – Vol. 22, No 6. – P. 1–11.

39. César M. et al. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of *R*-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. // Biotechnology Research and Innovation. – 2019. – Vol. 3, No 1. – P. 168–176.

40. Chatterjee T. Biotransformation of geraniol by *Rhodococcus* sp. strain GR3 // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – P. 303–306.

41. Chen G. et al. Anti-arthritic activity of *D*-carvone against complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats through modulation of inflammatory cytokines // Korean Journal of Physiology and Pharmacology. – 2020. – Vol. 24, No 6. – P. 453–462.

42. Chen L. et al. Screening a strain of *Klebsiella* sp. O852 and the optimization of fermentation conditions for trans-dihydrocarvone production // Molecules. – 2021. – Vol. 26, No 9. – Art. 2432.

43. Chen Z. et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the *de novo* production of ethylene glycol from glucose // Metabolic Engineering. – 2016. – Vol. 33. – P. 12–18.

44. Cheng Z. et al. Kinetic analysis and bacterium metabolism of α -pinene by a novel identified *Pseudomonas* sp. strain // Journal of Environmental Sciences. –

2012. – Vol. 24, No 10. – P. 1806–1815.

45. Cheremnykh K.M. et al. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus actinobacteria* // Journal of Hazardous Materials. – 2018. – Vol. 346. – P. 103–112.

46. Chiu C.C., Keeling C.I., Bohlmann J. Toxicity of pine monoterpenes to mountain pine beetle // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, No 1. – P. 6–13.

47. Danielli L.J. et al. Influence of monoterpenes in biological activities of *Nectandra megapota* (Spreng.) Mez essential oils // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, No 3. – Art. 112.

48. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R. Biotransformations // Comprehensive Biotechnology, Second Edition. – 2011. – Vol. 2. – P. 451–460.

49. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R.. Maintenance of cell viability in the biotransformation of (–)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis* // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2002. – Vol. 19. – P. 389–398.

50. de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R.. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: Induction after cell growth on limonene and toluene // Tetrahedron Asymmetry. – 2003a. – Vol. 14, No 24. – P. 3925–3931.

51. de Carvalho C.C.C.R., Keulen F. Van, da Fonseca M.M.R. Biotransformation of limonene-1,2-epoxide to limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis* cells: an introductory approach to selective hydrolysis and product separation // Food Technology and Biotechnology. – 2000. – Vol. 38, No 3. – P. 181–185.

52. Devi J.R., Bhattacharyya P.K. Microbiological transformations of terpenes: Part XXIV–Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol & limonene by *Pseudomonas incognita* (linalool strain) // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. – 1977. – Vol. 14. – P. 359–363.

53. Duetz W.A. et al. Biotransformation of D-Limonene to (+)-trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, No 6. – P. 2829–2832.

54. Eddy N.B., Leimbach, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and

dithienylbutylamines // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1953. – Vol. 107. – P. 385-393.

55. Elansary H.O. et al. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2018. – Vol. 18, No 1. – P. 1–10.

56. Elkin A.A. et al. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Vol. 89. – P. 82–85.

57. Esmaeili A., Hashemi E. Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas aeruginosa* // Chemistry Central Journal. – 2011. – Vol. 5, No 1. – P. 26.

58. Fedyunina I.V et al. New aspects of using biologically active thioterpenoids of pinane series // Russian Chemical Bulletin. – 2019. – Vol. 68, No 5. – P. 1031–1035.

59. Fernandes P. Microlitre/millilitre shaken bioreactors in fermentative and biotransformation processes a review // 2006. – Vol. 24, No 4. – P. 237–252.

60. Flemming H.C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Vol. 14, No 9. – P. 563–575.

61. Gavaric N. et al. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of thyme and oregano essential oils , thymol and carvacrol and their possible synergism // 2015. – Vol. 18, No 4. – P. 1013–1021.

62. Giang P.D. et al. CYP108N12 initiates *p*-cymene biodegradation in *Rhodococcus globerulus* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2022. – Vol. 730. – Art. 109410.

63. Giang P.D. et al. Cymredoxin, a [2Fe–2S] ferredoxin, supports catalytic activity of the *p*-cymene oxidising P450 enzyme CYP108N12 // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2023. – Vol. 737. – Art. 109549.

64. Giang P.D. et al. CYP108N14: A monoterpene monooxygenase from *Rhodococcus globerulus* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2024. – Vol. 752. – Art. 109852.

65. Gogoleva O.A., Nemtseva N.V, Bukharin O.V. Catalase activity of

hydrocarbon oxidizing bacteria // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2012. – Vol. 48, No 6. – P. 552–556.

66. Goudarzi S., Rafieirad M. Evaluating the effect of α -pinene on motor activity, avoidance memory and lipid peroxidation in animal model of Parkinson disease in adult male rats // Research Journal of Pharmacognosy. – 2017. – Vol. 4, No 2. – P. 53–63.

67. Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // Process Biochemistry. – 2013. – Vol. 48, No 11. – P. 1640–1644.

68. Grogan G. et al. P450camr, a cytochrome P450 catalysing the stereospecific 6-*endo*-hydroxylation of (1*R*)-(+)-camphor // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Vol. 59, No 4. – P. 449–454.

69. Hikal W.M. et al. Chemical composition and biological significance of thymol as antiparasitic // Open Journal of Ecology. – 2021. – Vol. 11. – P. 240–266.

70. Hong Y.A. et al. Metabolic engineering of the borneol and camphor degradation pathways in *Pseudomonas* to produce optically pure bicyclic monoterpenes // Enzyme and Microbial Technology. – 2024. – Vol. 181. – P. 110527.

71. Hu Y. et al. Expanding the terpene universe: synthetic biology and non-natural chemistry in engineered microorganisms // Molecules. – 2025. – Vol. 30, No 20. – Art. 4065.

72. Huang M. et al. Synthesis and antitumor evaluation of compounds as potential PI3K/Ak /mTOR signaling pathway inhibitor // Frontiers in Chemistry. – 2022. – Vol. 9. – P. 1–16.

73. Ilyina I.V. et al. Highly potent activity of isopulegol-derived substituted octahydro-2*H*-chromen-4-ols against influenza A and B viruses // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2018. – Vol. 28, No 11. – P. 2061–2067.

74. Ivanova K. M., Grishko V.V., Ivshina I.B. Highly efficient biodegradation of ecotoxic dehydroabietic acid by resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107 // Microbiology. – 2022. – Vol. 91, No 4. – P. 364–377.

75. Ivshina I.B. et al. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and

immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28, No 10. – P. 2997–3006.

76. Ivshina I.B. et al. Biotransformation of (–)-isopulegol by *Rhodococcus rhodochrous* // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15, No 8. – Art. 964.

77. Jakubovska J., Meškys R. Characterization of 1,8-cineole degradation encoding operon from *Rhodococcus* sp. TMP1 // Chemija. – 2016. – Vol. 27, No 1. – P. 84–91.

78. Kang B. et al. Protective effect of isopulegol in alleviating neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced BV-2 cells and in parkinson disease model induced with MPTP // Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer. – 2021. – Vol. 40, No. 3. – P. 75-85.

79. Kang W. et al. Carvone decreases melanin content by inhibiting melanoma cell proliferation via the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No 21. – Art. 5191.

80. Khaiper M. et al. Seasonal variations in leaf essential oil of *Eucalyptus tereticornis* clones: yield, composition analysis and antioxidant potential // Biomass and Bioenergy. – 2026. – Vol. 207. – Art. 108658.

81. Khaleel C., Tabanca N., Buchbauer G. α -Terpineol, a natural monoterpene: a review of its biological properties // Open Chemistry. – 2018. – Vol. 16, No 1. – P. 349–361.

82. Khalifaev P.D. et al. Chemical composition of the essential oil from the roots of *Ferula kuhistanica* growing wild in Tajikistan // Natural Product Communications. – 2018. – Vol. 13, No 2. – P. 219–222.

83. Khoo K.S. et al. Nanomaterials utilization in biomass for biofuel and bioenergy production // Energies. – 2020. – Vol. 13, No. 4. Art. 892.

84. Khvostov M.V, Borisov S.A., Tolstikova T.G. Supramolecular complex of ibuprofen with larch polysaccharide arabinogalactan: studies on bioavailability and pharmacokinetics // European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2016. – Vol. 42, No 3. – P. 431–440.

85. Kim J. et al. Seasonal variations of monoterpene emissions from coniferous trees of different ages in Korea // *Chemosphere*. – 2005. – Vol. 59. – P. 1685–1696.
86. Kong A.S. et al. Harnessing monoterpenes and monoterpenoids as weapons against antimicrobial resistance // *Polish Journal of Microbiology*. – 2025. – Vol. 74, No 1. – P. 1–18.
87. Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // *Catalysts*. – 2019. – Vol. 9, No 3. – P. 23–30.
88. Kuyukina M.S. et al. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // *Journal of Microbiological Methods*. – 2005. – Vol. 65, No 3. – P. 596–603.
89. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications // In: *Microbiology Monographs*. Ed. A. Steinbuchel. Dordrecht; London; New York: Springer-Verlag. – 2010. – Vol. 16. – P. 292–313.
90. Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2002. – Vol. 66, No 8. – P. 1619–1627.
91. Kylosova T.I. et al. Biotransformation of prochiral sulfides into (R)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2016. – Vol. 123. – P. 8–13.
92. Laribi B. et al. Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes: a comparative study // 2013. – Vol. 41, No 1. – P. 312–318.
93. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation // *Advances in Applied Microbiology*. – 2006. – Vol. 59, No 6. – P. 1–29.
94. Le T.M. et al. Synthesis and medicinal chemical characterisation of antiproliferative O,N-functionalised isopulegol derivatives // *RSC advances*. – 2024. – Vol. 14, No. 26. – P. 18508–18518.

95. Le T. M. et al. Synthesis and transformation of (–)-isopulegol-based chiral β -aminolactones and β -aminoamides // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, No 11. – P. 1–19.
96. Lee S. et al. Mycobiology Biotransformation of (–)- α -pinene by whole cells of white rot fungi, *Ceriporia* sp. ZLY-2010 and *Stereum hirsutum* // Mycobiology. – 2018. – Vol. 43, No 3. – P. 297–302.
97. Lewin G.R. et al. Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy applications // Annual review of microbiology. – 2016. – Vol. 70, No 1. – P. 235.
98. Li-Zhulanov N.S. et al. Synthesis of 1,3-oxazine derivatives based on (–)-isopulegol using the ritter reaction and study of their analgesic activity // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2020. – Vol. 56, No 7. – P. 936–941.
99. Lievano R. et al. Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using *Nocardia corallina* B-276 // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 3148–3154.
100. Linares D., Fontanille P., Larroche C. Exploration of α -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Application to novalic acid production in a bioreactor // Food Research International. – 2009. – Vol. 42, No 4. – P. 461–469.
101. Litsanov B., Brocker M., Bott M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78, No 9 – P. 3325–3337.
102. Liu J. et al. Analysis of the mechanism for enhanced pyrene biodegradation based on the interactions between iron-ions and *Rhodococcus ruber* strain L9 // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2021. – Vol. 225. – P. 112789.
103. Liu S.H. et al. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: a mini review // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 224. – P. 25–33.
104. Luchnikova N.A. et al. Biotransformation of oleanolic acid using

Rhodococcus rhodochrous IEGM 757 // Catalysts. – 2022. – Vol. 12, No 11. – P. 1–16.

105. Luchnikova N.A. et al. *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1360, an effective biocatalyst of C3 oxidative transformation of oleanane triterpenoids // Microbiology. – 2023. – Vol. 92, No 2. – P. 204–214.

106. Lüddecke F., Harder J. Enantiospecific (S)-(+)-linalool formation from β -myrcene by linalool dehydratase-isomerase // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2011. – Vol. 66. – P. 409–412.

107. Malankina E.L. et al. Chemical features of varieties long-leaved mint (*Mentha longifolia* L.) // Lomonosov chemistry journal. – 2025. – Vol. 66, No1. – P. 72–80.

108. Maltseva P.Y. et al. Bioinformatics analysis of the genome of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362, an (–)-isopulegol biotransformer // Genes. – 2024. – Vol. 15, No 8. – Art. 992.

109. Maltseva P.Y. et al. *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362 immobilized in macroporous PVA cryogel as an effective biocatalyst for the production of bioactive (–)-isopulegol compounds // Pharmaceuticals. – 2025. – Vol. 18, No 6. – Art. 839.

110. Maltseva P.Y., Plotnitskaya N.A., Ivshina I.B. Transformation of terpenoids and steroids using actinomycetes of the genus *Rhodococcus* // Molecules. – 2024. – Vol. 29, No 14. – Art. 3378.

111. Maltseva P.Y., Plotnitskaya N.A., Ivshina I.B. Molecular-genetic research of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1362, an active (–)-isopulegol biotransformer // Molecules. – 2025. – Vol. 30. – Art. 3976.

112. Marmulla R. et al. The anaerobic linalool metabolism in *Thauera linaloolentis* 47 Lol // BMC Microbiology. – 2016. – Vol. 16, No 76. – P. 1–8.

113. Marumoto S. et al. Biotransformation of (–)-(1R,4S)-menthone and (+)-(1S,4R)-menthone by the common cutworm *Spodoptera litura* larvae // Journal of Oleo Science. – 2017. – Vol. 66, No 8. – P. 883–888.

114. Marumoto S. et al. Biotransformation of (+)-carvone and (–)-carvone by the common cutworm *Spodoptera litura* larvae // Journal of Oleo Science. – 2018. – Vol. 67, No 10. – P. 1253–1257.

115. Mathela C.S., Singh K.K., Gupta V.K. Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. – 2010. – Vol. 67, No 4. – P. 375–380.
116. Minh Le T., Szakonyi Z. Enantiomeric isopulegol as the chiral pool in the total synthesis of bioactive agents // *Chemical Record*. – 2022. – Vol. 22, No 1. – Art. e202100194.
117. Misson M., Zhang H., Jin B. Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications // *Journal of the Royal Society, Interface*. – 2015. – Vol. 12, No 102. – Art. 20140891.
118. Mołdoch J. et al. Biological activity of monoterpene-based scaffolds: a natural toolbox for drug discovery // *Molecules*. – 2025. – Vol. 30, No 7. – Art. 1480.
119. Molina G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(–)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 174. – P. 606–613.
120. Mrunalini B.R., Girisha S.T. Screening and characterization of lipid inclusions in bacteria by fluorescence microscopy and mass spectrometry as a source for biofuel production // *Indian Journal of Science and Technology*. – 2017. – Vol. 10, No 21. – P. 1–7.
121. Mukhtar S. et al. Actinomycetes: a source of industrially important enzymes // *Journal of Proteomics & Bioinformatics*. – 2017. – Vol. 10, No 12. – P. 316–319.
122. Mukhtar Y.M. et al. Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs // *Bioscience Reports*. – 2018. – Vol. 38, No 6. – P. 1–12.
123. Mulyukin A.L. et al. Comparative study of the elemental composition of vegetative and resting microbial cells // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 71, No 1. – P. 31–40.
124. Muruganathan U., Srinivasan S. Beneficial effect of carvone, a dietary monoterpene ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats // *Biomedicine and*

Pharmacotherapy. – 2016. – Vol. 84. – P. 1558–1567.

125. Narushima H., Omori T., Minoda Y. Microbial oxidation of β -myrcene // In: Fermentation Products. Ed. Murray M-Y., Claude V., Kartar S. Pergamon, 1981. – P. 525–531.

126. Nazimova E.V. et al. Influenza antiviral activity of Br-containing [2*R*,4*R*(*S*),4*aR*,7*R*,8*aR*]-4,7-dimethyl-2-(Thiophen-2-YL)octahydro-2*H*-chromen-4-ols prepared from (–)-isopulegol // Chemistry of Natural Compounds. – 2017. – Vol. 53, No 2. – P. 260–264.

127. Neumann G. et al. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size // Extremophiles. – 2005. – Vol. 9, No 2. – P. 163–168.

128. Neverova O.A., Tsandekova O.L. Research terpene fraction of essential oil of needles of scots pine (*Pinus sylvestris* L.), growing under waste dump kedrovsky coal cut // Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya. – 2017. – No 2. – P. 101–106.

129. Ojeda-Sana A.M. et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components // Food Control. – 2013. – Vol. 31, No 1. – P. 189–195.

130. Perez-Pantoja D. et al. Endogenous stress caused by faulty oxidation reactions fosters evolution of 2, 4-dinitrotoluene- degrading bacteria // PLoS Genet. – 2013. – Vol. 9, No 8. – Art. e1003764.

131. Périco L.L. et al. Systematic analysis of monoterpenes: advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, No 2. – P. 265.

132. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Research. – 2001. – Vol. 29, No 9. – P. 16–21.

133. Pimentel M.R. et al. Biotransformation of citronellol in rose oxide by *Pseudomonas* spp. // 2012. – Vol. 27, No 1960. – P. 295–300.

134. 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. – Vol. 16, No 7. – P. 1–13.

135. Próspero D.F.A. et al. Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway // *Chemico-Biological Interactions*. – 2018. – Vol. 293. – P. 55–60.
136. Rajeswara Rao B.R. et al. Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook // *Flavour and Fragrance Journal*. – 2003. – Vol. 18, No 2. – P. 133–135.
137. Ramos A.D.S. et al. Hydroxylation of 1,8-cineole by *Mucor ramannianus* and *Aspergillus niger* // 2015. – Vol. 264. – P. 261–264.
138. Ramos A.G.B. et al. Antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the monoterpene isopulegol and its β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex in animal inflammation models // *Foods*. – 2020. – Vol. 9., No. 5. – Art. 630.
139. Rocha D.J.P.G. et al. Gene expression analysis in bacteria by RT-qPCR // *Methods in molecular biology*. – 2020. – Vol. 2065. – P. 119–137.
140. Rocha D.J.P., Santos C.S., Pacheco L.G.C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis // *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. – 2015. – Vol. 108, No 3. – P. 685–693.
141. Roh C. et al. Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680 // *JBIOSEC*. – 2009. – Vol. 108, No 1. – P. 41–46.
142. Sabry O.M. et al. Cytotoxic halogenated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum* // *Natural Product Research*. – 2017. – Vol. 31, No 3. – P. 261–267.
143. Sakhno T. M. et al. Component composition of essential oil in the North American *Pinus* L. species introduced to the Southern Coast of Crimea // *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. – 2021. – Vol. 182, No 3. – P. 44–53.
144. Sales A. et al. Establishment of culture conditions for biotransformation of R-(+)-limonene to limonene-1,2-diol by *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864 // *Process Biochemistry*. – 2019. – Vol. 78. – P. 8–14.
145. Sankaranarayanan C., Kalaivani K. Isopulegol mitigates hyperglycemia mediated oxidative and endoplasmic reticulum stress in HFD/STZ induced diabetic rats // *Archives of Medical Research*. – 2020. – Vol. 51, No. 3. – P. 204–214.

146. Sassa T. et al. (+)-Menthol and its hydroxy derivatives, novel fungal monoterpenols from the fusicoccin-producing fungi, *Phomopsis amygdali* F6a and *niigata* 2 // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2003. – Vol. 67, No 3. – P. 475–479.
147. Sawamura N., Shima S., Sakai H. Conversion of (–)-menthone by *Pseudomonas fluorescens* M-2 // Agricultural and Biological Chemistry. – 1976. – Vol. 40, No 4. – P. 649–653.
148. Sazykin I. et al. Cyclohexane, naphthalene, and diesel fuel increase oxidative stress, *CYP153*, *sodA*, and *recA* gene expression in *Rhodococcus erythropolis* // MicrobiologyOpen. – 2019. – Vol. 8, No 9. – P. 1–9.
149. Schempp F.M. et al. Investigation of monoterpenoid resistance mechanisms in *Pseudomonas putida* and their consequences for biotransformations // Applied microbiology and biotechnology. – 2020. – Vol. 104, No 12. – P. 5519–5533.
150. Schewe H. et al. Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases // Process Biochemistry. – 2011. – Vol. 46, No 10. – P. 1885–1899.
151. Seubert W. Degradation of isoprenoid compounds by micro-organisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. // Journal of Bacteriology. – 1960. – Vol. 79. – P. 426–434.
152. Shukla O.P., Bartholomus R.C., Gunsalus I.C. Microbial transformation of menthol and menthane-3,4-diol // Canadian Journal of Microbiology. – 1987. – Vol. 33, No 6. – P. 489–497.
153. Silva E.A.P. et al. Monoterpenes and their derivatives as agents for cardiovascular disease management: a systematic review and meta-analysis // Phytomedicine. – 2021. – Vol. 88. – Art. 153451.
154. Silva F.V. et al. Anti-Inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano // Journal of Medicinal Food. – 2012. – Vol. 15, No 11. – P. 984–991.
155. Silva L.Y. et al. Evaluation of the inhibitory effect of isopulegol (ISO) and its β -cyclodextrin inclusion complex (ISO/ β -CD) on the reversal of *Staphylococcus aureus* efflux pump activity // Polymer Bulletin. – 2024. – Vol. 81, No. 11.

156. Silva M.I.G. et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2007. – Vol. 88, No. 2. – P. 141 – 147.
157. Silva M.I.G. et al. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity // *Fitoterapia*. – 2009. – Vol. 80. – No. 7. – P. 506 – 513.
158. Silva M.I.G. et al. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 380. – P. 233–245.
159. Singh R.V. et al. Enzyme immobilization on nanomaterials and their applications // *Materials*. – Vol. 18, No 17. – Art. 4106.
160. Sobhy H., Colson P. Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments // *Comparative and Functional Genomics*. – 2012. – P. 1–5.
161. Su A. et al. Cutinases as stereoselective catalysts: specific activity and enantioselectivity of cutinases and lipases for menthol and its analogs // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2020. – Vol. 133. – Art. 109467.
162. Tagnaout I. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Thymus broussonetii* Boiss and *Thymus capitatus* (L.) Hoffmann and link essential oils // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, No 7. – P. 1–16.
163. Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // *Process Biochemistry*. – 2017. – Vol. 52. – P. 1–9.
164. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2015. – Vol. 148. – P. 63-106.
165. Thompson M.L. et al. Biotransformation of β -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 85, No 3. – P. 721–730.
166. Tian K. et al. The analysis of estrogen-degrading and functional metabolism genes in *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 // *International Journal of Genomics*. – 2020. – Art. 9369182.

167. Tolstikova T.G. et al. The analgesic activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathie- pine-6-amine and its hydrochloride // Letters in Drug Design & Discovery. – 2012. – Vol. 9. – P. 513–516.
168. Toniazzo G. et al. Biotransformation of (-)- β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642 // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2005. – Vol. 121. – P. 837–844.
169. Torres-Pag N. et al. Herbicidal potential of the natural compounds carvacrol, thymol, eugenol, p-cymene, citral and pelargonic acid in field conditions: indications for better performance // Agronomy. – 2024. – Vol. 14. – P. 537.
170. Vieira A.J. et al. Limonene: aroma of innovation in health and disease // Chemico-Biological Interactions. – 2018. – Vol. 283. – P. 97–106.
171. Vranová E., Coman D., Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis // Annual Review of Plant Biology. – 2013. – Vol. 64. – P. 665–700.
172. Wannaz E.D., Zygodlo J.A., Pignata M.L. Air pollutants effect on monoterpenes composition and foliar chemical parameters in *Schinus areira* L. // Science of the Total Environment. – 2003. – Vol. 305. – P. 177–193.
173. Werf M.J. Van der, Bont J.A.M.D. Screening for microorganisms converting limonene into carvone // Studies in Organic Chemistry. – 1998. – Vol. 53. – P. 231–234.
174. Werf M.J. Van Der et al. Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14: an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1999. – Vol. 52, No 3. – P. 380–385.
175. Werf M.J. Van Der et al. Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14. A novel nicotinoprotein belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, No 37. – P. 26296–26304.
176. Werf M.J. Van Der, Swarts H.J., Bont J.A.M.D. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene // Applied and

Environmental Microbiology. – 1999. – Vol. 65, No 5. – P. 2092–2102.

177. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // Nature Protocols. – 2008. – Vol. 3, No 2. – P. 163–175.

178. Williams D.R., Trudgill P.W., Taylor D.G. Metabolism of 1,8-cineole by a *Rhodococcus* species: ring cleavage reactions // Microbiology. – 1989. – Vol. 135, No 7. – P. 1957–1967.

179. Ye L. et al. Optimizing the localization of astaxanthin enzymes for improved productivity // Biotechnology for Biofuels. – 2018. – Vol. 11, No 1. – P. 1–9.

180. Yoo S.K., Day D.F., Cadwallader K.R. Bioconversion of α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN // Process Biochemistry. – 2001. – Vol. 36, No 10. – P. 925–932.

181. Zamyad M. et al. The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats // Arquivos de Neuro-Psiquiatria. – 2019. – Vol. 77, No 2. – P. 106–114.

182. Zhang X. et al. Bacterial cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective steroid hydroxylation enabled by directed evolution and rational design // Bioresources and Bioprocessing. – 2020. – Vol. 7, No 1. – P. 1–8.

183. Zielińska-Błajet M., Feder-Kubis J. Monoterpenes and their derivatives – recent development in biological and medical applications // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, No 19. – P. 1–38.