

УДК 547.92;579.222

## ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ СТЕРОИДОВ МИЦЕЛИЕМ *Curvularia lunata* В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛ- $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА

© 2011 г. В. А. Андрияшина, А. В. Дружинина, В. В. Ядерец, Т. С. Стыщенко, Н. Е. Войшвилло

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: verayaderetz@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.09.2009 г.

С помощью мицелия *Curvularia lunata*, суспендированного в фосфатном буфере с метил- $\beta$ -циклодекстрином (МЦД), трансформировано 16  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидрокси- и  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана и прегна-на. Выделено 20 моногидрокси- и дигидроксипродуктов, структура которых установлена с помощью спектров протонно-магнитного резонанса и масс-спектров. Гидроксилирование  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидроксистероидов осуществлялось преимущественно в положение  $7\alpha$ , тогда как гидроксилирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов – в положение  $11\beta$ . Исключение составили андрост-4-ен-3,17-дион,  $9\alpha$ -гидроксиандростендион и андроста-1,4-диен-3,17-дион, гидроксилирование которых происходило в основном в положение  $14\alpha$ . При трансформации прогестерона и гидроксиметилпрегнадиенона, помимо основных  $11\beta$ -производных, выделены  $6\beta$ - и  $7\beta$ -гидроксипроизводные с выходом 10 и 30% соответственно. МЦД использовали в отношении к трансформируемому стероиду 1 : 1 (моль/моль). При максимальной концентрации кортексолона 20 г/л и ацетата андростенолона 10 г/л в присутствии МЦД получены соответственно гидрокортизон и  $7\alpha$ -гидроксиандростенолон с выходом 55 и 77%. В отсутствие МЦД наблюдались адсорбция стероидов на мицелии, более низкая скорость их трансформации, невысокие концентрации модифицируемых субстратов и низкий выход соответствующих гидроксипроизводных.

В промышленном синтезе лекарственных препаратов стероидной природы необходимыми этапами являются модификации стероидной молекулы с помощью микроорганизмов (гидроксилирование, 1,2-дегидрирование, расщепление боковой цепи стероидов и др.) [1–4]. Их преимущество перед химическими реакциями заключается в высокой регио- и стереоспецифичности и экологичности. Однако при проведении указанных биотрансформаций, вследствие ничтожной растворимости стероидов в водной среде (несколько мг/л), существует проблема повышения доступности стероидных субстратов к микробной клетке и увеличения их содержания в реакционной среде [1–3].

Способ диспергирования стероидов в культуральной жидкости с помощью смешивающихся с водой органических растворителей лишь частично решает проблему и только при трансформации так называемых “гидрофильных” стероидов. По сравнению с ним способ применения стероидов в виде

водной суспензии с размером частиц не более 10 мкм дает возможность увеличить содержание стероидных субстратов до 50 г/л [1, 2]. Но этот способ не пригоден для процессов, в которых стероидный субстрат или продукт его трансформации токсичны для микроорганизма. Например, андростадиендион (АДД), образуемый при отщеплении боковой цепи стероидов, токсичен для бактерий в концентрации выше 0.8 г/л [5].

Высоких концентраций стероидных субстратов удается достичь, используя способ, предложенный в 1981 г. учеными фирмы Геден Рихтер (“Gedeon Richter”, Венгрия), а именно, трансформации стероидов, солюбилизированных в водных средах с помощью макроциклических  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -циклодекстринов [6, 7]. Указанные циклодекстрины, главным образом  $\beta$ -циклодекстрин (ЦД), образуют со стероидами растворимые в воде комплексы, что позволяет увеличить содержание стероидов в трансформационной среде до 10 г/л [8]. Наличие ЦД в реакциях гидроксилирования, 1,2-дегидрирования, восстановления 17-кетогруппы стероидов и окисления  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидроксистероидов в  $\Delta^4$ -3-кетостероиды, катализируемых свободными или иммобилизованными клетками бактерий и грибов, в 2 раза сокращало время трансформации, способствовало повышению выхода продуктов реакции и в некоторых случаях изменяло их соотношение [9–15].

При замене ЦД его химически модифицированными производными – метил-ЦД (МЦД), гидрокс-

**Сокращения:** АД – андростендион, АДД – андростадиендион, ДЭА – дегидроэпиандростерон (андростенолон), АДЭА – ацетат ДЭА, ДГА –  $3\beta,17\beta$ -дигидроксиандрост-5-ен, ТГА –  $3\beta,7\alpha,17\beta$ -тригидроксиандрост-5-ен,  $\Delta^5$ -ПГ – прегненолон,  $\Delta^4$ -ПГ – прогестерон, 17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ –  $17\beta$ -гидроксипрогестерон, 16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ –  $16\alpha,17\alpha$ -эпоксипрогестерон, в-во “S” – кортексолон (вещество “S” Рейхштейна), в-во “F” – гидрокортизон (вещество “F” Кендалла), MAR и TAR – моно- и триацетат вещества “R” Рейхштейна, ГМЦД – 21-гидрокси-20-метилпрегна-1,4-диен-3-он, ЦД –  $\beta$ -циклодекстрин, МЦД – метил- $\beta$ -циклодекстрин, ГПЦД – гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин.

сипропил-ЦД (ГПЦД) и др. – содержание стероидов в водной среде составило не менее 20 г/л. При такой нагрузке с помощью актинобактерий осуществлены 1,2-дегидрирование гидрокортизона и андростендиона, а также отщепление боковой цепи стероидов [16–18]. Данные гидроксилирования стероидов грибами в присутствии химически модифицированных циклодекстринов в литературе отсутствуют [1–4, 6, 19].

Цель работы – гидроксилирование с помощью штаммов гриба *Curvularia lunata*  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидрокси- и  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана и прегнана в виде комплексов с метил- $\beta$ -циклодекстрином.

### МЕТОДИКА

Трансформации  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов выполняли с помощью гриба *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 [20], трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов – с помощью *Curvularia lunata* ВКПМ F-988 [21]. Для солиubilизации трансформируемых стероидов использовали  $\beta$ -циклодекстрин (ЦД), метилированный по случайным положениям  $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин – (ГПЦД), Китай. Отношение циклодекстринов к трансформируемому стероиду составляло 1 : 1 (моль/моль).

Культивирование и трансформацию стероидов проводили в конических колбах объемом 750 мл, при 28°C, на качалке – 220 об/мин; культивирование – в 100 мл питательной среды, трансформацию – в 75 мл 1/15 М фосфатного буфера. Штамм F-981 выращивали на среде (г/л): сахароза – 30,0, дрожжевой автолизат – 2,5, NaNO<sub>3</sub> – 2,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3,0, KCl – 0,55, MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 0,5, pH 6,0–6,3 (среда I). Штамм F-988 выращивали на среде (г/л): глюкоза – 20,0, пептон – 5,0, дрожжевой экстракт – 5,0, соевая мука – 10,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 4,0, pH 6,0–6,3 (среда II).

Среды засеивали суспензией спор грибов, выращенных в течение 7–10 сут на скошенном агаре, приготовленном на основе среды для штамма F-981. Культивирование 1 генерации осуществляли 3 сут и использовали в качестве посевного материала, который вносили в свежую среду (I или II). Через 32–34 ч роста мицелий отделяли от среды и суспендировали в буферном растворе в количестве 9,5–19,0 г/л (в пересчете на вес сухой биомассы), в который предварительно вносили циклодекстрин и микрокристаллический стероид. Полученную суспензию распределяли в несколько колб. Через определенные интервалы инкубации отбирали пробы в количестве не менее 5 мл, которые экстрагировали этилацетатом.

**Анализ продуктов трансформации.** Качественный анализ продуктов трансформации проводили с помощью ТСХ, для чего использовали пластинки Silufol UV 254 (“Kavalier”, Чехословакия) и Sorbfil (“Imid Ltd”, Россия). Разделение стероидных со-

единений проводили в системе растворителей ацетон–хлороформ (7 : 3). После разделения продуктов трансформации  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов хроматограммы проявляли 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе водной хлорной кислоты; визуальную оценку продуктов трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Для определения содержания исходных  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов и продуктов их трансформации этилацетатный экстракт упаривали досуха, взвешивали и определяли процентное содержание стероидов в пробах с помощью спектра протонно-магнитного резонанса. Содержание в реакционной смеси  $\Delta^4$ -3-кетостероидных субстратов и продуктов их трансформации оценивали с помощью ВЭЖХ [20].

**Выделение продуктов гидроксилирования.** После окончания трансформации мицелий отделяли и проверяли его на наличие стероидных соединений. При их отсутствии экстрагировали этилацетатом только водную фракцию до полного извлечения стероидов. Экстракт упаривали. Если мицелий содержал продукты трансформации, его также экстрагировали этилацетатом. Экстракты объединяли и упаривали в вакууме. Полученный остаток промывали эфиром и отфильтровывали кристаллические продукты, выход (В) которых рассчитывали по формуле:  $V = 100 \times M_{\text{п}}/M_{\text{с}} \times (M_{\text{пр}}/M_{\text{сб}})$ , где M<sub>п</sub> – масса выделенного кристаллического продукта, M<sub>с</sub> – количество взятого в реакцию субстрата, M<sub>пр</sub> – молекулярная масса продукта, M<sub>сб</sub> – молекулярная масса субстрата.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Гидроксилирование  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов.** На схеме (рис. 1) видно, что все  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероиды (дегидроэпиандростерон (ДЭА), ацетат ДЭА (АДЭА), 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -дигидроксиандрост-5-ен (ДГА) и его 3 $\beta$ -ацетат, прегненолон ( $\Delta^5$ -ПГ), 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -эпокси-прегненолон (16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ), моноацетат и триацетат вещества “R” Рейхштейна (MAR и TAR) после трансформации с помощью мицелия *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 содержат 7 $\alpha$ -гидроксигруппу.

Хорошо известна способность различных штаммов *C. lunata* к 11 $\beta$ -гидроксилированию и к 14 $\alpha$ -гидроксилированию некоторых  $\Delta^4$ -3-кетостероидов [1–4, 22], но способность этого вида к селективному 7 $\alpha$ -гидроксилированию  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов показана нами впервые [20].

**Трансформация дегидроэпиандростерона (ДЭА).** При нагрузке ДЭА или АДЭА в количестве 2 г/л, внесенных в буферный раствор в виде мелкокристаллической суспензии, полная конверсия в 7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА происходила с помощью 10 г/л мицелия (в пересчете на вес сухой биомассы) за 24 и 20 ч соответственно (рис. 2); 7 $\alpha$ -гидроксилирова-

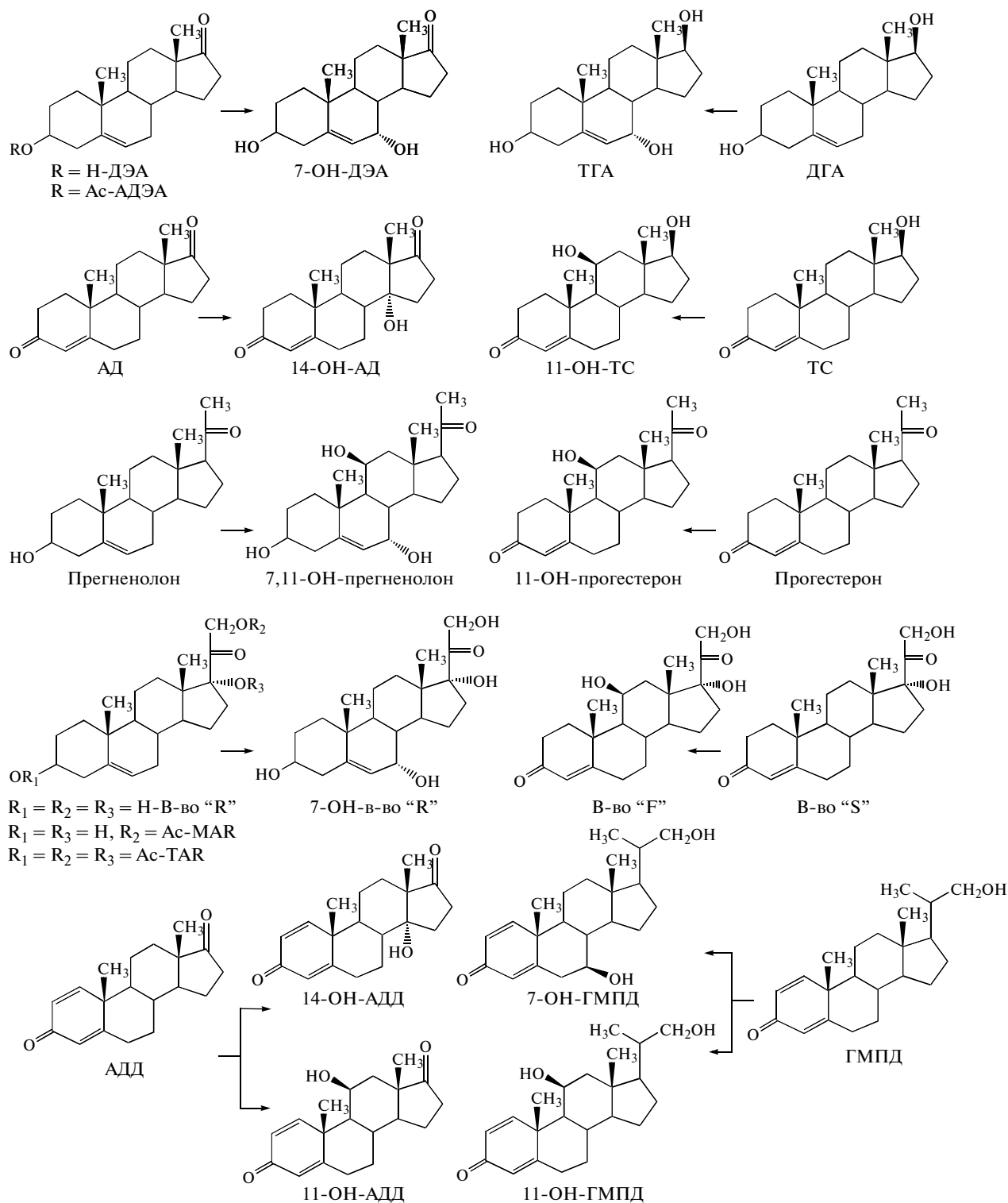
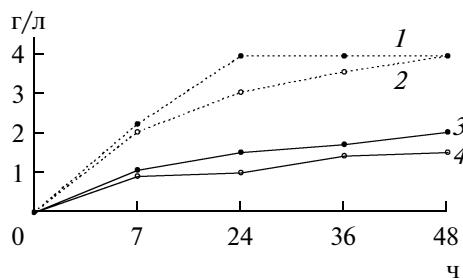


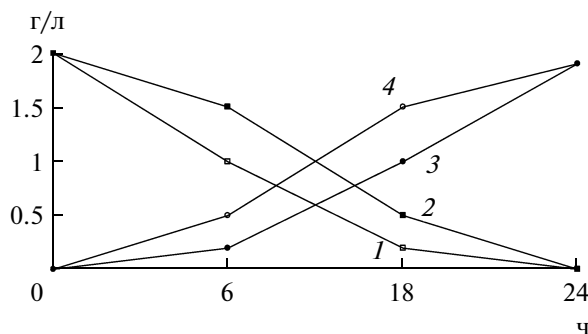
Рис. 1. Схема гидроксилирования стероидов штаммами *Curvularia lunata*.

ние протекало с образованием незначительного количества продукта восстановления 17-кетогруппы —  $3\beta,7\alpha,17\beta$ -тригидроксиандрост-5-ена (ТГА). ТГА представляет интерес в качестве перспективного

соединения для синтеза стероидных препаратов, но в данной реакции являлся побочным продуктом [23]. При увеличении содержания микрокристаллов АДЭА в реакционной смеси до 5 г/л наблюда-



**Рис. 2.** Скорость образования 7α-ОН-ДЭА в зависимости от количества мицелия и присутствия МЦД при содержании АДЭА 5 г/л: 1 – комплекс АДЭА с МЦД, биомасса 18.5 г/л, 2 – комплекс АДЭА с МЦД, биомасса 10 г/л, 3 – микрокристаллы АДЭА, биомасса 18.5 г/л, 4 – микрокристаллы АДЭА, биомасса 10 г/л.



**Рис. 3.** Трансформация 3β,17β-дигидроксиандрост-5-ена в количестве 2 г/л (биомасса 9.5 г/л): 1 – субстрат ДГА в комплексе с МЦД; 2 – микрокристаллы ДГА; 3 – продукт ТГА из микрокристаллического субстрата; 4 – продукт ТГА в присутствии МЦД.

лось ингибирование трансформации, и количество 7α-гидрокси-ДЭА не превысило 1 г/л. На его выход не повлияло увеличение массы биокатализатора до 18.5 г/л (рис. 2).

Существенное влияние на скорость конверсии АДЭА и выход 7α-гидрокси-ДЭА оказало присутствие в реакционной среде МЦД в сочетании с двойным количеством мицелия (рис. 2). Содержание 7α-гидрокси-ДЭА при трансформации 5 г/л АДЭА в виде комплекса с МЦД уже через 24 ч составило 85%.

Результаты гидроксилирования 10 г/л АДЭА в комплексе с ЦД, МЦД и ГПЦД при молярном отношении АДЭА-циклодекстрин 1 : 1, представлены в табл. 1. Трансформация продолжалась 44 ч. За этот период в присутствии МЦД достигнута максимальная степень конверсии АДЭА в 7α-гидрокси-ДЭА, который выделен с выходом 77%. Высокое содержание 7α-гидрокси-ДЭА в реакционной смеси (90%) наблюдалось также при использовании ГПЦД. Однако ГПЦД по сравнению с МЦД образовывал более прочный комплекс с 7α-гидрокси-ДЭА, что затруднило выделение продукта, и вследствие чего он был получен с меньшим выходом – 65% (табл. 1). В присутствии как МЦД, так и ГПЦД, наблюдалось минимальное образование побочного ТГА (в контроле без солюбилизатора – 15%, в опыте с МЦД – 3%). При солюбилизации АДЭА с помощью ЦД содержание 7α-гидрокси-ДЭА в реакционной массе не превышало 50%. Кроме того, ЦД образовывал с ним еще более прочный комплекс, чем ГПЦД, вследствие чего выход выделенного продукта составил лишь 20.5% (табл. 1).

*Трансформация 3β,17β-дигидроксиандрост-5-ена (ДГА).* Результаты трансформации ДГА и его ацетата в количестве 2–5 г/л аналогичны результатам гидроксилирования ДЭА и АДЭА. При трансформации ДГА в количестве 2 г/л (в виде микрокристаллов либо в виде комплекса с МЦД) полная конверсия в ТГА (содержание в реакционной смеси 70 и 75% соответственно) наблюдалась через 20–24 ч инкубации.

Скорость гидроксилирования в виде комплекса с МЦД лишь незначительно увеличивалась по сравнению с контролем (рис. 3). Трансформация 5 г/л ДГА в виде комплекса с МЦД заканчивалась за 30 ч, причем содержание ТГА в реакционной смеси составило 80% (табл. 2), тогда как конверсия 5 г/л ДГА в виде микрокристаллов даже через 48 ч была неполной и количество 7α-гидроксипродукта не превышало 20%.

*Трансформация прегненолона (Δ<sup>5</sup>-ПГ), 16α,17α-эпоксипрегнонона (16,17-эпокси-Δ<sup>5</sup>-ПГ), моноацетата и триацетата в-ва “R” (MAR и TAR).* В указанные субстраты мицелий *S. lunata* вводил гидроксигруппу не только в 7α-положение, но и в 11β-положение, причем трансформация Δ<sup>5</sup>-ПГ происходила с образованием 7α,11β-дигидроксипродукта, а не моногидроксисоединений (табл. 2). В отличие от ДЭА и ДГА, а также их ацетатов, получить практически значимый выход гидроксипроизводных указанных Δ<sup>5</sup>-стероидов (за исключением 16,17-эпоксис-Δ<sup>5</sup>-ПГ), даже при низкой нагрузке 2 г/л оказалось возможным лишь в присутствии МЦД (табл. 2). В отсутствие солюбилизатора через 27 ч трансформации Δ<sup>5</sup>-ПГ и 23 ч трансформации MAR и TAR общий выход выделенных стероидов составил не более 10–25%, по-ви-

**Таблица 1.** Влияние циклодекстринов на трансформацию АДЭА при нагрузке 10 г/л

Полимер	Содержание стероидов в реакционной смеси, %			Выход 7α-ОН-ДЭА, %
	АДЭА	ТГА	7α-ОН-ДЭА	
ЦД	45	5	50	20.5
МЦД	5	3	92	77
ГПЦД	10	следы	90	65
Контроль*	70	15	15	9

\* Трансформация без полимера.

**Таблица 2.** Продукты гидроксирования стероидов ряда андростана (1–7) и прегнана (8–16) мицелием *Curvularia lunata*, образуемые в присутствии МЦД и в отсутствие солилизатора (контроль)

№	Стероидный субстрат	Содержание, г/л	Продукты трансформации	Содержание гидроксистероидов в реакционной смеси, %	
				МЦД	контроль*
С19-стероиды					
1	ТС	4.0	11 $\beta$ -гидрокси-ТС	75	35
2	АД	4.0	14 $\alpha$ -гидрокси-АД	70	25
			11 $\beta$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-АД	15	10
3	9-ОН-АД	2.0	9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-АД	55	50
4	АДД	3.0	14 $\alpha$ -гидрокси-АДД	70	5
5	ДГА	5.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДГА	80	20
6	ДЭА	4.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА	85	10
7	АДЭА	10.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА	95	15
С21-стероиды					
8	$\Delta^5$ -ПГ	2.0	7 $\alpha$ ,11 $\beta$ -дигидрокси- $\Delta^5$ -ПГ	70	10
9	$\Delta^4$ -ПГ	2.0	11 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	40	10
			7 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	35	15
			6 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	10	–
10	17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ	2.0	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -дигидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	85	70
11	16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ	2.0	7 $\alpha$ -гидрокси-16,17 $\alpha$ -эпокси- $\Delta^5$ -ПГ	80	75
12	16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ	1.0	11 $\beta$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-16,17 $\alpha$ -эпокси- $\Delta^4$ -ПГ	50	10
13	MAR	2.0	В-во "R"	30	–
			7 $\alpha$ -гидрокси-"R"	30	15
			11 $\beta$ -гидрокси-"R"	25	10
14	TAR	1.0	В-во "R"	60	–
			7 $\alpha$ -гидрокси-в-во "R"	20	10
			11 $\beta$ -гидрокси-в-во "R"	15	5
15	В-во "S"	10.0	В-во "F"	65	55
			14 $\alpha$ -гидрокси-в-во "S"	30	40
С22-стероиды					
16	ГМПД	4.0	11 $\beta$ -гидрокси-ГМПД	60	–
			7 $\beta$ -гидрокси-ГМПД	30	–
			7 $\beta$ ,11 $\beta$ -дигидрокси-ГМПД	–	15

димому, вследствие интенсивной деструкции как исходного субстрата, так и продуктов реакции.

**Гидроксирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов.** Условия трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов, которую осуществляли с помощью *Curvularia lunata* ВКПМ F-988, отличающегося от предыдущего штамма наличием маркера резистентности к антибиотику генетицину "G-418", были те же, что и в выше приведенных примерах, но мицелий для трансформации выращивали в среде, в которой минеральный источник азота был заменен на органический. Для оценки гидроксильной активности гриба в отношении солилизированных с помощью МЦД  $\Delta^4$ -3-кетостерои-

дов выбраны андростаны – тестостерон (ТС), андростендион (АД), 9 $\alpha$ -гидрокси-АД (9-ОН-АД), андростадиендион (АДД) и прегнаны – прогестерон ( $\Delta^4$ -ПГ), 17 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ (17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ), 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -эпокси-прогестерон (16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ), кортексолон (в-во "S") и его ацетат, 21-гидрокси-20-метилпрегна-1,2-диен-3-он (ГМПД) (рис. 1). Выбор этих стероидов обусловлен тем, что ТС, АД,  $\Delta^4$ -ПГ, 16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ и ацетат в-ва S являются  $\Delta^4$ -3-кетостероидными аналогами ДГА, ДЭА,  $\Delta^5$ -ПГ, 16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ и MAR соответственно. Кроме того, АД, а также 9-ОН-АД и АДД, представляли ин-

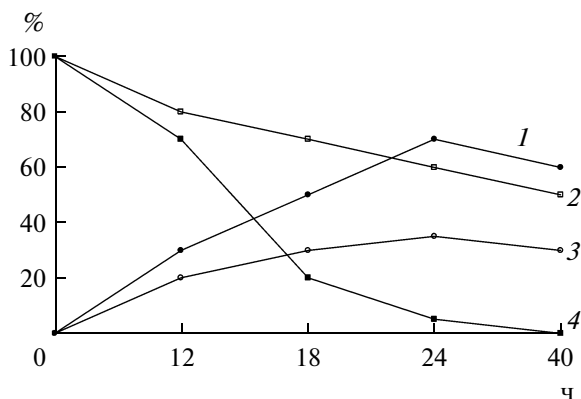


Рис. 4. Динамика трансформации (%) 4 г/л ТС (биомасса 12 г/л): 1 – 11β-ОН-ТС в присутствии МЦД; 2 – микрокристаллы ТС; 3 – 11β-ОН-ТС из микрокристаллического ТС, 4 – ТС в комплексе с МЦД.

терес еще как субстраты для гидроксилирования в 14α-положение в присутствии МЦД.

**Трансформация тестостерона (ТС).** Установлено, что *S. lunata* вводит гидроксигруппу в ТС также, как в стероиды ряда прегнана в 11β-положение. Динамика 11β-гидроксилирования ТС при нагрузке 4 г/л в виде комплекса с МЦД и в его отсутствие показана на рис. 4. В присутствии МЦД конверсия ТС в 11β-гидрокси-ТС протекала без накопления побочных продуктов и заканчивалась за 24 ч. За это время в реакционной жидкости образовалось до 75% 11β-гидрокси-ТС, тогда как без солубилизатора накопилось только 35% продукта (табл. 2), после чего началась его деструкция.

**Трансформация андростенов АД, 9-ОН-АД, АДД.** Основными продуктами трансформации указанных 17-кетостероидов были 14α-гидроксипроизводные. В отсутствие МЦД 14α-гидрокси-АД (14-ОН-АД) получен с выходом 55–60% за 24–26 ч только при содержании АД не выше 2 г/л. В присутствии МЦД за такое же время была закончена полная конверсия 4 г/л АД в 14-ОН-АД, содержание которого в реакционной смеси составило 70%

(табл. 2). Выделено 62% 14-ОН-АД и в качестве побочного соединения 15% 11β,14α-дигидрокси-АД.

Поскольку дальнейшее повышение разовой дозы АД, даже в виде комплекса с МЦД, оказалось нежелательным вследствие увеличения количества побочных продуктов, были проведены 2 повторных цикла трансформации в водной фазе, полученной после отделения мицелия и экстракции продуктов трансформации. Оба цикла проводили с 4 г/л АД с использованием свежего мицелия (10–11 г/л), но без регенерации и добавления новой порции МЦД. При полной конверсии АД через 24 ч содержание 14-ОН-АД в водной фазе второго и третьего циклах трансформации составляло 60%. Таким образом, при использовании МЦД в количестве, рассчитанном на 4 г/л АД, в результате повторного применения этой же порции МЦД 12 г АД было конвертировано в 14-ОН-АД. Однако в 4 цикле гидроксилазная активность мицелия была низкой.

Трансформация 2 г/л 9-ОН-АД в 9α,14α-дигидрокси-АД и 1 г/л АДД в 14α-гидрокси-АДД проходила с высоким выходом при использовании как микрокристаллических, так солубилизованных с МЦД субстратов, но в последнем случае в 2 раза быстрее. Однако гидроксилирование АДД при содержании 3 г/л в отсутствие МЦД сопровождалось восстановлением 17-кетогруппы и деструкцией продукта восстановления – 1,2-дегидро-ТС.

Преобладание 14α-гидроксилазной активности по отношению к Δ<sup>4</sup>-3,17-дикетоандростенам отличает *S. lunata* от других видов грибов. Например, мицелий *Gongronella butleri* проявлял 7α-гидроксилазную активность не только при трансформации ДЭА, но и АД, образуя в качестве основных продуктов 7α-гидрокси-АД (27%) и 14-ОН-АД (22%), а также 6β- и 7β-гидрокси-АД в качестве побочных соединений [24].

**Трансформация прегненов Δ<sup>4</sup>-ПГ, 17-ОН-Δ<sup>4</sup>-ПГ, ГМПД, в-ва "S" и 21-ацетата в-ва "S".** Основным процессом трансформации указанных соединений было 11β-гидроксилирование. За исключением 17-ОН-Δ<sup>4</sup>-ПГ, даже при минимальном содержании остальных стероидов 1–2 г/л получить максимальный выход 11β-гидроксипроизводных оказалось

Таблица 3. Трансформация кортексолона с помощью мицелия *S. lunata* ВКПМ F-988

Нагрузка кортексолона, г/л	Массовое отношение стероид/метил-циклодекстрин	Время трансформации, ч	Общее содержание продуктов трансформации, %		Выход кристаллического гидрокортизона, %
			в водной фазе	в мицелии	
10.0	–	46	48.8	42.6	43.2
10.0	1/5	22	91.5	следы	58.0
15.0	1/5	24	96.0	следы	56.4
20.0	1/5	48	98.0	следы	55.0
20.0	1/3	50	76.6	10.5	52.0

возможным лишь в присутствии МЦД (табл. 2). Только из солюбилизованного ГМПД был получен 11 $\beta$ -гидрокси-ГМПД с выходом 50%.

На основании данных работы [25], гидроксипроизводные ГМПД могут представлять практический интерес. В указанной работе показано, что ГМПД и его 1,2-дигидроаналог являются лучшими индукторами 11 $\beta$ -гидроксилазы в мицелии *Cochliobolus lunatus* среди 24 исследованных стероидов.

В отличие от  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов, положение и ориентация вводимых в  $\Delta^4$ -3-кетостероиды побочных гидроксигрупп (6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 14 $\alpha$ -) зависели от структуры заместителей при С-17. Причем побочный продукт трансформации  $\Delta^4$ -ПГ — 7 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ выделен почти в равном количестве с основным 11 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ как в присутствии, так и в отсутствие МЦД (табл. 2). Побочными продуктами трансформации в-ва "S" и ГМПД были соответственно 14 $\alpha$ - и 7 $\beta$ -гидроксипроизводные. Полученные результаты согласуются с литературными данными о способности штаммов вида *C. lunata* к образованию в качестве побочных продуктов 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -гидроксистероидов [1–4, 26].

Высокая эффективность МЦД как солюбилизатора в-ва "S" — исходного соединения в синтезе большого количества лекарственных препаратов стероидной природы — показана в табл. 3. Введение 11 $\beta$ -гидроксигруппы в в-во "S", используемое в виде комплекса с МЦД в оптимальном отношении 1 : 1 (моль/моль) протекало при концентрации субстрата до 20 г/л в течение 48 ч без деструкции стероидов. В этом случае на мицелии отсутствовали продукты трансформации, что значительно упрощало выделение чистого гидрокортизона из водной фазы.

Анализ результатов гидроксилирования 16 стероидов в виде комплексов с химически модифицированными циклодекстринами дает основание считать последние более эффективными солюбилизаторами в реакции гидроксилирования, чем  $\beta$ -циклодекстрин. В частности, с помощью МЦД удалось увеличить содержание трансформируемых субстратов в реакционной среде до 10–20 г/л и ускорить их конверсию в целевые гидроксистероиды в 2 раза, а также повысить выход этих продуктов за счет отсутствия деструкции и уменьшения количества побочных соединений.

Следует также отметить, что в присутствии МЦД эффективно протекал ферментативный гидролиз. Как видно на примерах трансформации АДЭА, MAR и TAR в отсутствие МЦД, скорость гидролиза ацетоксигрупп была низкой.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sedlaczek L. // CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1988. V. 7. № 3. P. 187–236.
2. Ахрем А.А., Тумов Ю.А. // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. 526 с.
3. Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
4. Mahato S.B., Garai S. // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
5. Srivastava S.K., Srivastava R.A.K., Mathur S.N. // J. Appl. Bacteriol. 1985. V. 59. № 5. P. 399–402.
6. Szejtli J. // Pure Appl. Chem. 2004. V. 76. № 10. P. 1825–1845.
7. Udvardy E.N., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejtli J., Stadler A., Haben I., Balazs M. UK Patent Appl. 1983. № 2108965.
8. Суходольская Г.В., Донова М.В., Николаева В.М., Кощенико К.А., Довбня Д.В., Гулевская С.А. Патент РФ. 2000. № 2156302.
9. Алехина Т.М., Рыжкова В.М., Кураков В.В., Клубничкина Г.А. // Хим.-фарм. журн. 1993. Т. 4. № 2. С. 59–62.
10. Чинчокар С.Б., Суходольская Г.В., Баклашова Т.Г., Кощенико К.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 6. С. 685–693.
11. Fokina V.V., Karpov A.V., Sidorov I.A., Andrijushina V.A., Arinbasarova A.Yu. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 6. P. 645–649.
12. Singer Y., Shity H., Bar R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 35. № 6. P. 731–737.
13. Hesselink P.G.M., Van-Vliet S., De Vries H., Witholt B. // Enzyme Microb. Technol. 1989. V. 11. № 7. P. 398–404.
14. Schlosser D., Irrgang S., Schmauder H.-P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 39. № 1. P. 6–20.
15. Lu W. // Food Bioprod. Proc. 2007. V. 85. № 1. P. 63–72.
16. Донова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 1–14.
17. Jadoun J., Bar R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 40. № 4. P. 477–482.
18. Alexander D.L., Fischer J.F. // Steroids. 1995. V. 60. № 3. P. 290–294.
19. Del Valle E.M. // Process Biochem. 2004. V. 39. № 9. P. 1036–1046.
20. Андрюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 78–83.
21. Андрюшина В.А., Войшвилло Н.Е., Дружинина А.В., Стыценко Т.С., Ядерец В.В., Скрябин К.Г. // Патент РФ. 2008. № 2377309 // Бюл. Изобр. 2009. № 36.
22. Шувалова С.Д., Габинская К.Н., Попова Е.В., Савинова Т.С., Андрюшина В.А. // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 5. С. 44–46.
23. Chouhary M.I., Ali Shah S.A., Musharraf S.G., Shaheen F., Atta-Ur-Rahman // Nat. Prod. Res. 2003. V. 17. № 3. P. 215–220.
24. Kollerov V.V., Shutov A.A., Fokina V.V., Suhodolskaya G.V., Donova M.V. // J. Mol. Cat. B: Enz. 2008. V. 55. № 1. P. 61–68.
25. Undisz K., Groh H., Stopsack H., Horhold-Schubert C. // J. Steroid Biochem. 1992. V. 43. № 6. P. 547–547.
26. Charney W., Herzog H.L. // Microbial Transformation of Steroids. New York: Acad. Press, 1967. 728 p.

## Hydroxylation of Steroids by *Curvularia lunata* Mycelium in the Presence of Methyl- $\beta$ -cyclodextrine

V. A. Andrushina, A. V. Druzhinina, V. V. Yaderets, T. S. Stitsenko, and N. E. Voishvillo

*Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

Received September 18, 2009

**Abstract**—Transformation of 16  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy- and  $\Delta^4$ -3-ketosteroids of androstane and pregnane classes was carried out using *Curvularia lunata* mycelium suspended in phosphate buffer with methyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD). As the result, 20 monohydroxy- and dihydroxy-metabolites, whose structure was determined using specters of proton magnetic resonance and mass-specters, have been isolated. Hydroxylation of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy-steroids occurred mostly in the C-7 $\alpha$  position whereas hydroxylation of  $\Delta^4$ -3-ketosteroids was in the C-11 $\beta$  position. Only androst-4-en-3,17-dione, 9 $\alpha$ -hydroxyl-androstenedione, and androsts-1,4-diene-3,17-dione were hydroxylated at C-14 $\alpha$  position. Besides main 11 $\beta$ -derivatives, the 6 $\beta$ - and 7 $\beta$ -hydroxy-derivatives with yield 10 and 30%, respectively, were isolated during transformation of progesterone and hydroxymethyl pregnadienon. The ratio of MCD to transforming steroid was 1 : 1 (mol/mol). Hydroxycortisone and 7 $\alpha$ -hydroxyandrostenolone with the yield 55 and 77%, respectively, were obtained at the maximal concentrations of cortexolone 20 g/l and androstenolone acetate 10 g/l in the presence of MCD. Absorption of steroids on mycelium, lower speed of their transformation, low concentrations of modifying substrates, and low yield of hydroxyderivatives have been observed in the absence of MCD.