

УДК 547.92;572.152;579.873.21

ТРАНСФОРМАЦИЯ Δ^4 -3-КЕТОСТЕРОИДОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ АКТИНОБАКТЕРИИ *Rhodococcus erythropolis*

© 2011 г. Н. В. Карпова*, В. А. Андриюшина*, В. В. Ядерев*, А. В. Дружинина*, Т. С. Стыщенко*, Б. Л. Шаскольский**, В. И. Лозинский**, Лью Дук Хи***, Н. Е. Войшвилло*

*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: andryushina@rambler.ru

** Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, Москва, 119991

*** Институт химии, Вьетнамская Академия наук и технологий, Ханой

Поступила в редакцию 16.08.2010 г.

С помощью культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 из 11 стероидов ряда андростана и прегнана при содержании субстрата в реакционной среде 0.5–10 г/л получены соответствующие 9α -гидроксипроизводные. 9α -Моногидроксилирование протекало независимо от строения заместителя при С17. Однако структура стероидной молекулы влияла на время полной конверсии субстрата и выход продукта трансформации. При максимальном количестве андростендиона (АД) 10 г/л 9α -гидрокси-АД образовывался через 35 ч с выходом 85%. 9α -гидрокси-АД получали также с помощью клеток актинобактерии, включенных в криогель поливинилового спирта. При содержании в среде АД 4.0 г/л проведено 9 последовательных циклов трансформации с помощью иммобилизованных клеток. Содержание 9α -гидрокси-АД, образуемого в 6 циклах продолжительностью 22–24 ч каждый, составляло 98%.

Большинство стероидных лекарственных препаратов, используемых в настоящее время в медицине и ветеринарии, представляет собой структурные модификации природных соединений, по сравнению с которыми модифицированные производные обладают более высокой биологической активностью и меньшими побочными эффектами [1].

В синтезе многих препаратов используется способность микроорганизмов селективно осуществлять нужную трансформацию стероидных молекул заданной структуры, не требующую предварительной защиты имеющихся в молекуле функциональных групп, и в экологически чистых условиях. Более того, такие трансформации стероидов, как гидроксилирование, в частности гидроксилирование в положение С9 полициклической системы стероидной молекулы, химическим способом в промышленных масштабах практически не осуществимы [1–4].

Интерес к 9α -гидроксистероидам обусловлен тем, что они используются в качестве исходных продуктов для синтеза 11β -гидрокси- 9α -галоид-стероидов ряда прегнана, обладающих высокой антиаллергической, противошоковой и противовоспалительной активностью, таких, как триамцинолон, дексаметазон, синаflan и др. Они могут быть использованы как самостоятельные физиологически активные соединения, так и как интермедиаты в синтезе новых препаратов [2–7].

Способность вводить гидроксигруппу в положение С9 стероидной молекулы установлена у некоторых видов плесневых грибов и актинобактерий родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*. У грибов гидроксилирование атома углерода в то или иное положение молекулы стероида зависит от ее строения, тогда как бактерии способны к образованию 9α -гидроксипроизводных из соединений различных рядов и с самыми различными заместителями [5–10].

Условием эффективного 9α -гидроксилирования является применение ингибиторов 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназы или использование мутантных штаммов, у которых блокирован ее синтез [8–14]. Мутант *Nocardia canicruria* ATCC 31548, полученный под действием N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина, превращал в 9α -гидроксипроизводные 10 соединений андростановой и прегнановой серии в течение 30–47 ч при содержании субстрата в среде 1.75 г/л с выходом выделенных продуктов 7–45% [8]. Конверсия андростендиона (АД) за 15 ч в 9α -гидрокси-АД (**9-ОН-АД**) генетически модифицированным штаммом *Rhodococcus erythropolis* DSM 13157 при содержании стероида в среде 10 г/л составляла 92–96% [13].

Цель работы — получение 9α -гидроксипроизводных различных стероидов ряда андростана и прегнана с помощью клеток *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 и изучение возможности использования указанной бактерии в иммобилизованном состоя-

нии в качестве реагента для 9 α -гидроксилирования стероидов.

МЕТОДИКА

Условия культивирования и трансформации. Культивирование бактерии *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 [14], а также трансформацию стероидов свободными и иммобилизованными клетками (ИМК), осуществляли в кукурузно-глюкозной среде (КГС, г/л): кукурузный экстракт – 15.0, глюкоза – 10.0, K₂HPO₄ – 1.0, pH – 6.8–7.2, в колбах объемом 750 мл на качалке при 29°C и перемешивании 220 об/мин. Процессы получения посевного материала и инкубирования ИМК проводили в 100 мл КГС, процессы трансформации – в 50 мл КГС в колбах с отбойниками. Среду, предназначенную для трансформации, не стерилизовали, а лишь доводили до кипения, охлаждали до 20–30°C, после чего вносили стероиды. Содержание стероидов для трансформации свободными клетками составляло 0.5–10 г/л; АД, трансформируемого с помощью ИМК, 4 г/л.

Иммобилизация клеток. Клетки бактерии *R. erythropolis* ВКПМ Ас-1740 [14] выращивали 7–10 сут на агаровой КГС, агар-агар – 25 г/л. Клетки с агара пересеивали в жидкую КГС и выращивали культуру в течение 70–72 ч. Полученный посевной материал переносили в свежую КГС и осуществляли культивирование в течение 46–48 ч. Биомассу, выделенную из 1.2 л культуральной жидкости центрифугированием при 3000 g (2.16 г в пересчете на вес сухих клеток), иммобилизовали включением в гранулы криогеля поливинилового спирта (ПВС) в соответствии с известной методикой [15, 16], для чего использовали ПВС со степенью деацетилирования 99–100% и молекулярной массой 86000 Да (“Acros”, Бельгия). Гранулы иммобилизованного биокатализатора диаметром 2 мм формировали с помощью специальной криогрануляционной установки [17] из 10%-ной (на влажный вес биомассы) суспензии клеток в 10%-ном водном растворе ПВС согласно методике, подробно изложенной в работе [18]. Температура криогенной обработки составляла –15°C, продолжительность выдерживания в замороженном состоянии 15 ч; полученные гранулы в количестве 220 мл оттаивали 6 ч при +4°C, промывали стерильным физраствором и инкубировали в среде КГС в течение 24 ч.

Трансформация с помощью ИМК. Гранулы отделяли от питательной среды с помощью мелкоячеистого сита, ресуспендировали в свежей КГС, содержащей 4 г/л АД и 4% диметилформамида (ДМФА), и помещали на качалку для проведения трансформации.

Об окончании реакции судили с помощью ТСХ. После завершения трансформации гранулы отделяли от среды, промывали физраствором, суспендировали повторно в свежей КГС с АД и аналогично осуществляли все последующие циклы трансформации. В случае невозможности осуществления следующего цик-

ла после окончания предыдущей трансформации гранулы помещали в физраствор и хранили при +4°C 48–72 ч.

Трансформация в колбах. Для трансформации стероидов с нагрузкой 0.5–4.0 г/л использовали культуру *R. erythropolis* ВКПМ Ас-1740 в возрасте 22–24 ч, которую вносили в количестве 20 об. % в колбы с КГС и стероидом. Стероид вносили в охлажденную КГС в виде микрокристаллов (до 20 мкм) в растворе ДМФА или в виде комплекса с метилированным по случайным положениям циклодекстрином (МЦД).

Трансформация в ферментере и выделение 9-ОН-АД. Процесс гидроксилирования АД осуществляли в ферментере общим объемом 15 л, рабочий объем 6 л, скорость вращения мешалки 800–900 об/мин, концентрация растворенного кислорода (рО₂) до 70% от насыщения, среда КГС с 20–25 г/л глюкозы (дробное внесение), pH 7.4–7.6, АД (98%-ного содержания, 60 г), температура 27.5–28.2°C, избыточное давление (ΔP) 0.1–0.15 мПа. АД добавляли в КГС в виде пасты стероида, переосажденного в воду из раствора в ДМФА.

Биомассу *R. erythropolis* объемом 2 л вносили дробно с интервалом 10–12 ч. Для получения указанного объема декантировали 4 л культуральной жидкости, находившейся в течение 100–120 ч в холодильнике при +4°C. Вместе со второй порцией биомассы вносили глюкозу в количестве 10 г/л. При необходимости через 10 ч вносили еще одну порцию глюкозы в количестве 5 г/л. По окончании процесса трансформации АД (через 35 ч) культуральную жидкость, pH которой доводили до 3.0, три раза экстрагировали 18 л этилацетата равными объемами. Экстракты объединяли и обрабатывали активированным углем (12 г). Экстракт отфильтровывали от угля и упаривали на роторном испарителе. Остаток после упаривания (62.5 г) в течение 30 мин обрабатывали насыщенным раствором NaHCO₃ при перемешивании. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального pH, затем промывали эфиром порциями по 70 мл 3 раза. Осадок сушили при 65°C и получали 53.85 г 9-ОН-АД 98.6%-ного содержания, т. пл. 222–224°C (лит. данные 221–224°C [8]).

Анализ продуктов реакции. Конечное содержание в реакционной смеси 9-ОН-АД, образуемого ИМК, оценивали с помощью ВЭЖХ на хроматографе (“Gilson”, США) при 254 нм. Колонка с Silasorb C-18 (4.0 × 250 мм), зернение 10 мкм. Скорость потока 0.8 мл/мин. Подвижная фаза MeOH–H₂O (70 : 30).

Выход 9 α -гидроксипроизводных, образуемых растущими клетками, определяли по количеству выделенного кристаллического продукта. О ходе процесса и его окончании судили с помощью ТСХ на пластинках “Sorbfil” (“Imid Ltd”, Россия), система хлороформ–ацетон 7 : 3. Строение полученных гидроксистероидов устанавливали сравнением с за-

Таблица 1. Гидроксилирование стероидов ряда андростана и прегнана культурой *R. erythropolis* Ac-1740

Трансформируемый стероид	Нагрузка, г/л	Способ внесения	Время трансформации, ч	9 α -гидрокси-производное	
				Выход %	T _{пл.} , °C
Андростендион (АД, I),	4.0	в ДМФА	22–24	95	222–224
	10.0		32–36	85	
Тестостерон (II)	1.0	микрористаллы	18–20	85*	221–223
Циангидрин-I (III)	0.5	микрористаллы	18–20	46*	220–223
14 α -гидрокси-АД (IV)	1.0	в ДМФА	18–20	85	238–242
19-нортестостерон (V)	1.0	комплекс с МЦД	19–20	65**	218–223
Спиродиен (VI)	4.0	комплекс с МЦД	15–16	60	240 с разложением
17 α -метил-тестостерон (VII)	4.0	комплекс с МЦД	20–22	70	192–194
		в ДМФА	24–26	70	
17 α -гидрокси-прогестерон (VIII)	1.0	комплекс с МЦД	19–20	57	250–253
16-дегидро-прогестерон (IX)	1.0	комплекс с МЦД	17–19	50	***
Кортексолон (X)	2.0	в ДМФА	20–22	80	>250
16 α -метил кортексолон (XI)	2.0	в ДМФА	24–26	85	255-257
	4.0		46–48	55	

* Продукт 9 α -гидрокси-АД.

** Продукт 9 α -гидрокси-19-нор-АД.

*** 9 α -гидрокси-16-дегидропрогестерон получен в смеси с продуктом восстановления 20-кетогруппы.

ведомыми образцами. При отсутствии таковых – определяли методом ПМР-спектроскопии. Спектры снимали на приборе “Varian”-400 (США) в CDCl₃.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены данные трансформации Δ^4 -3-кетостероидов ряда андростана: АД (I), тестостерон (ТС, II), циангидрин-АД (III), 14 α -гидрокси-АД (IV), 19-нор-ТС (V), 17 β -гидрокси-3-кето-4,6-андростадиен-17 α -пропионовой кислоты γ -лактон (спиродиен, VI), 17 α -метил-ТС (VII) и ряда прегнана: 17 α -гидрокси-прогестерон (VIII), 16-дегидропрогестерон (IX), кортексолон (“S”, X), 16 α -метил-“S” (XI).

Количество стероидов, указанных в табл. 1, было определено с учетом их растворимости в водной среде и доступности для культуры родококка. Подбор индивидуальных оптимальных условий гидроксилирования I, VI, VII и X (способ внесения стероида, плотность биомассы, концентрация глюкозы, интенсивность аэрации) позволил сократить время

трансформации и увеличить содержание в среде указанных стероидов с 1.75 г/л [8] до 4.0–10 г/л.

Условия, определенные опытами в колбах, подтверждены результатами трансформации 10 г/л I в виде аморфных частиц в ферментере, для увеличения доступности которых к клеткам бактерии в среду добавляли ДМФА. При внесении посевного материала (7.2 г/л на 6 л жидкости по весу сухой биомассы) трансформация 60 г АД полностью заканчивалась через 32–36 ч с выходом кристаллического 9-ОН-АД 85% и чистотой 98.6% согласно ВЭЖХ-анализу.

Результаты трансформации соединений I и XI отражают зависимость эффективности процесса от структуры трансформируемого стероида. В случае I увеличение его количества в трансформационной среде незначительно влияло на выход целевого кристаллического продукта, тогда как при увеличении количества XI всего лишь в 2 раза выход 9-гидрокси-производного уменьшался на 30% (табл. 1).

Природа заместителей при положении C17 в кольце D всех исследуемых стероидов (рис. 1) не оказывала влияния на направленность гидроксилирования

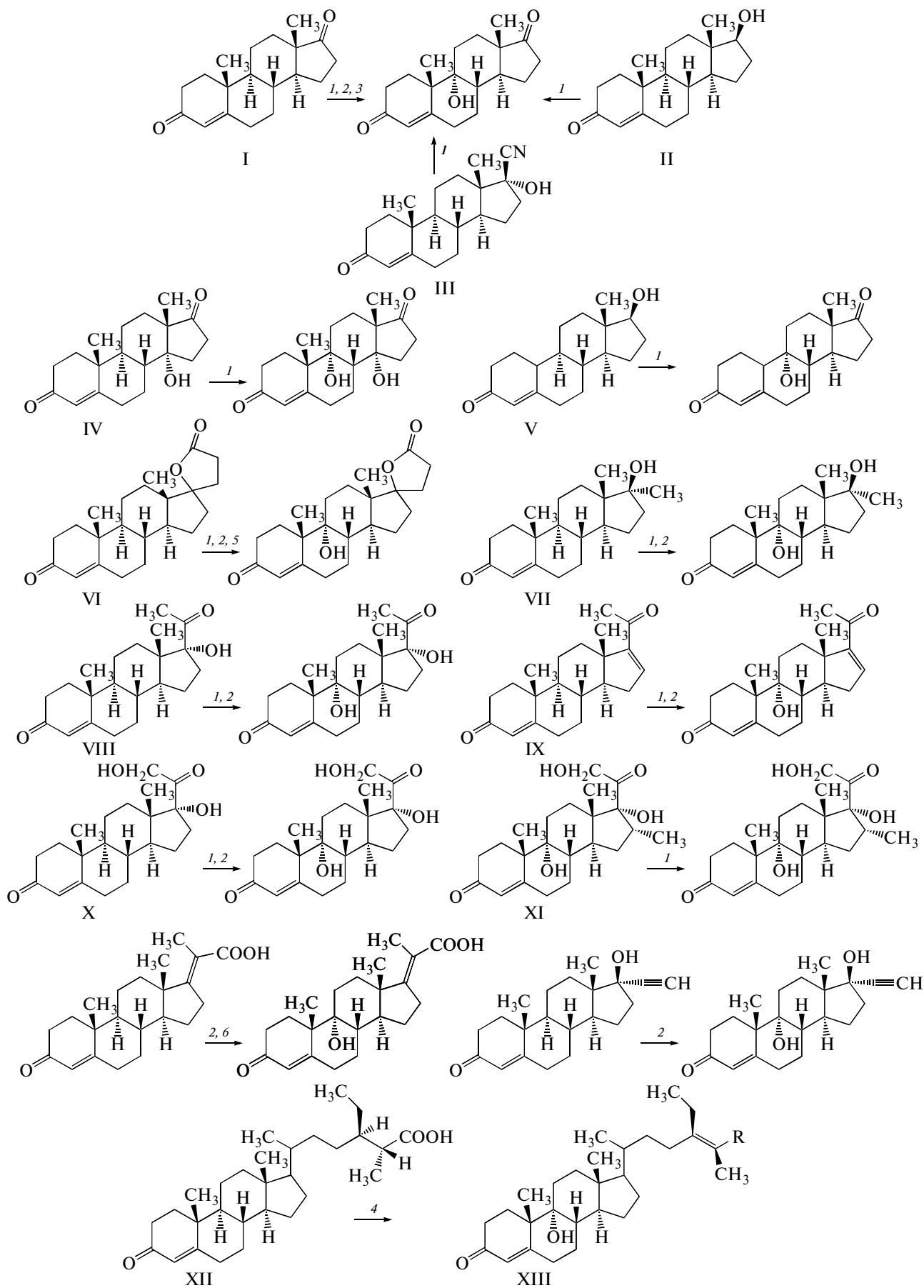


Рис. 1. Структура стероидных субстратов и продуктов трансформации, полученных с помощью: 1 – *R. erythropolis* Ac-1740, 2 – *N. canincuria* ATCC 31548 [8], 3 – *Rhodococcus* sp. [10] 4 – *Mycobacterium* sp. [21], 5 – *R. equi* ATCC 21329 [25], 6 – *Mycobacterium* sp. [6, 12]. Обозначения I–XIII см. в тексте.

культуры *R. erythropolis* Ac-1740. Моно-9 α -гидроксилирование протекало с образованием соответствующих гидроксипроизводных без накопления побочных соединений. Однако трансформация ТС и 19-нор-ТС сопровождалась дополнительным окислением 17-гидроксигруппы и образованием соответственно 9-ОН-АД и 9 α -гидрокси-19-нор-АД. Циангидринная группировка в III легко элиминировалась в условиях проведения ферментации, и конечным продуктом трансформации был также 9-ОН-АД (рис. 1). Трансформация III явилась единственным примером 9 α -гидроксилирования с низким выходом продукта реакции – не более 50% и высоким содержанием неконвертируемого АД. По-видимому, накапливающиеся в результате снятия циангидринной защиты цианиды ингибировали действие 9 α -гидроксилазы. У прегнанов восстановление кетогруппы наблюдалось лишь при трансформации IX, однако в этом случае, в отличие от III, имела место полная конверсия субстрата в 9 α -гидроксипроизводное.

Анализ литературных данных по гидроксилированию стероидов показал, что, в отличие от бактериального процесса, при гидроксилировании грибами наблюдается наличие определенной зависимости направления вводимой гидроксигруппы от структуры стероидной молекулы. Например, при замене 17-кетогруппы на гидроксильную, т.е. замене I на II, вместо образования 14 α -гидрокси-АД мицелием *Curvularia lunata* накапливался 11 β -гидрокси-ТС [3, 19].

Высокая степень конверсии прегнанов в 9 α -гидроксипроизводные культурами *R. erythropolis* Ac-1740 и родительского штамма [10], вероятно, связана с неспособностью клеток расщеплять боковую цепь при C17. Вследствие этого родококк не трансформировал холестерин и фитостерин в 9 α -гидроксисоединения, которые были получены в результате полного или частичного расщепления боковой цепи стероидов некоторыми мутантными штаммами актинобактерий родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* [5, 6, 11, 12, 20]. Условием образования 9 α -гидроксисоединений указанными бактериями являлось наличие кислородного заместителя в модифицированной боковой цепи. Так, генетически измененная микобактерия [20] конвертировала ситостерин сначала в Δ^4 -3-кето-стигмастен-26-овую кислоту XII, которая затем служила предшественником 9 α -гидроксипроизводного XIII (рис. 1).

Еще в 1973 г. интерпретируя результаты трансформации стероидов грибами, проф. Джонс предложил триангулярную модель гидроксилирования [21]. Согласно этой модели, подробно рассматриваемой в обзорах [3, 22–24], ориентированное гидроксилирование стероидной молекулы происходит при участии двух кислородсодержащих заместителей, кото-

рые выполняют функцию фиксации фермента с субстратом. При наличии только одного центра связывания, закрепленная на ферменте молекула как бы “раскачивается” вокруг центра связывания, подвергая каталитическому действию гидроксилазы непредсказуемые положения полициклической стероидной системы [21].

Анализ результатов, полученных с *R. erythropolis* Ac-1740, и литературных данных [5–12] дает основание считать, что для направленного гидроксилирования стероидов бактериями, так же, как и грибами, необходимо наличие в молекуле более одного кислородного заместителя. Также следует заметить, что данные, представленные в табл. 1, и результаты гидроксилирования стероидов с помощью *N. canincuria* и *Rhodococcus* sp. [8, 10, 25] свидетельствуют о способности актинобактерий вводить 9 α -гидроксигруппу в стероидную молекулу независимо от ее строения (рис. 1).

При осуществлении трансформации с помощью *R. erythropolis* Ac-1740 отсутствует необходимость соблюдения строгой стерильности процессов, что существенно для получения 9-гидроксисоединений в промышленном масштабе. Кроме того, декантированная биомасса может не менее 1 мес храниться при 4 $^{\circ}$ C без потери гидроксилазной активности. Все это позволило получить для 9 α -гидроксилирования биокатализатор длительного действия в виде ИмК. В качестве носителя был выбран криогель ПВС, хорошо зарекомендовавший себя во многих микробиологических процессах [16] и, в частности, как гелевая матрица для иммобилизованных клеток, осуществляющих 1,2-дегидрирование стероидов [26, 27].

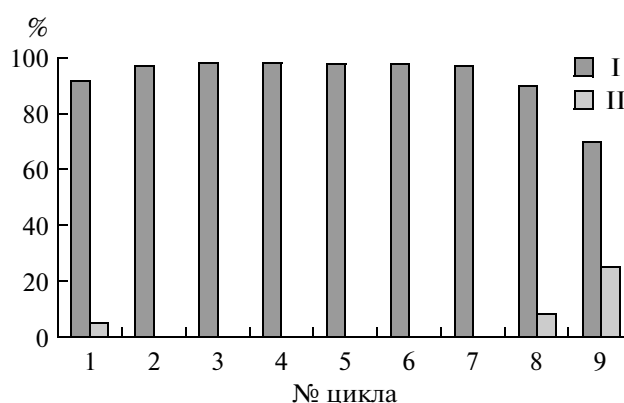


Рис. 2. Конверсия АД в количестве 4 г/л в 9-ОН-АД в зависимости от длительности применения ИмК *R. erythropolis* Ac-1740. I – 9-ОН-АД, II – АД.

Таблица 2. Содержание 9-ОН-АД в конце трансформационных циклов (ИмК)

№ цикла	Интервал между циклами		Время трансформации, ч	9-ОН-АД, %	АД, %
	время, ч	№/№ цикла			
1			20	92	5
2	72*	1/2	23	97	—
3	1	2/3	24	98	—
4	1	3/4	24	98	—
5	48*	4/5	22	98	—
6	1	5/6	22	98	—
7	1	6/7	23	97	—
8	1	7/8	23	90	8
9	72*	8/9	25	70	25

* Хранение при +4°C.

** Прочерк означает отсутствие субстрата.

В результате включения бактерии *R. erythropolis* Ас-1740 в криогель ПВС нами был получен гранулированный биокатализатор, далее использованный в нескольких последовательных циклах трансформации АД.

Было проведено 9 циклов трансформации I, продолжительность каждого из которых составила 20–25 ч (табл. 2). Таким образом, период использования ИмК составил 403 ч, из них общее время трансформации 206 ч и время нахождения ИмК в нерабочем состоянии 197 ч. В шести циклах (2–7) трансформация закончилась без остаточного АД. В 9-ом цикле активность ИмК уменьшилась примерно на 30% (рис. 2).

Точная причина такого явления нами пока не установлена, хотя снижение активности различных ИмК с увеличением числа рабочих циклов в периодических биотрансформационных процессах вполне обычный эффект, как правило, связанный с постепенным исчерпанием резерва кофакторов, если между циклами не проводится инкубация иммобилизованного биокатализатора в культуральной среде [28]. Для микробных клеток (*Citrobacter intermedius*, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*), включенных в макропористый криогель ПВС, аналогичный эффект в одноферментных биотрансформациях тоже известен [29–32]. В дальнейшем предполагается изучить оптимальные условия хранения ИмК и поддержания их максимальной 9 α -гидроксилазной активности.

Полученные результаты позволяют рассматривать ИмК *R. erythropolis* Ас-1740 как эффективный биокатализатор многократного действия, снижаю-

щий “потребление” биомассы, существенно облегчающий выделение продукта реакции и хранения культуры, что особенно важно для целей масштабирования. Следует также отметить, что в отличие от ранее известного иммобилизованного биокатализатора 1,2-дегидрирования стероидов [25, 26], где в качестве носителя клеток также использовался криогель ПВС, описанная в данной работе новая биокаталитическая система обладала значительно более широкими возможностями в отношении субстратной специфичности, что позволяет получать большой спектр стероидных производных, необходимых для создания новых медицинских препаратов, как было продемонстрировано на примере трансформации соединений I–XI (рис. 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tong W.-Y., Dong X.* // Recent Pat. Biotechnol. 2009. V. 3. № 2. P. 141–153.
2. *Zaks A., Dodds D.R.* // Drug Discov. Dev. 1998. V. 1. № 3. P. 290–303.
3. *Holland H.L.* // Steroids. 1999. V. 64. № 3. P.178–186.
4. *Breslow R., Jan J., Belvedere S.* // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. № 3. P. 363–365.
5. *Imada Y., Misuno S.* // Патент США. 1981. № 4255344.
6. *Slijkhuis H., Marx A.F.* // Патент США. 1994. № 5298398.
7. *Донован М.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 41. № 1. С. 1–14.
8. *Marsheck W.J., Jui J., Wang P.T.* // Патент США. 1983. № 4397947.

9. *Fernandes P., Cruz F., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // *Enz. Microb. Technol.* 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
10. *Datcheva V.K., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V., Vlachov R.J.* // *Steroids.* 1989. V. 54. № 3. P. 271–287.
11. *Knight J.C., Wovcha M.G.* // *Steroids.* 1980. V. 36. № 6. P. 723–730.
12. *Jekkel A., Csajagi E., Ilkoy E., Ambrus G.* // *J. Gen. Microbiol.* 1989. V. 135. № 6. P. 1727–1733.
13. *Ван дер Гейзе Р., Хесселс Г., Дейкхейзен Л.* // Патент РФ № 2268935 // Б.И. 2006. № 03.
14. *Войшвилло Н.Е., Родина Н.В., Андриюшина В.А., Стыценок Т.С., Скрябин К.Г.* Патент РФ № 2351645 // Б.И. 2009. № 10.
15. *Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* А.с. № 1400071 // Б.И. 1988. № 20.
16. *Lozinsky V.I., Plieva F.M.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1998. V. 23. № 3/4. P. 227–242.
17. *Лозинский В.И., Зубов А.Л.* // Патент РФ № 2036095 // Б.И. 1995. № 15.
18. *Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B., Lozinsky V.I.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 2005. V. 95. № 3. P. 529–538.
19. *Андриюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценок Т.С., Войшвилло Н.Е.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 1. С. 69–74.
20. *Ambrus G., Ilkoy E., Horvath G., Podanyi B., Vocskai Z., Gyurky S., Jekkel A.* // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. № 36. P. 5267–5268.
21. *Jones E.R.H.* // *Pure Appl. Chem.* 1973. V. 33. № 1. P. 39–52.
22. *Holland H.L.* // *Chem. Soc. Reviews.* 1982. V. 11. № 4. P. 371–395.
23. *Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В.* // *Успехи химии.* 1992. Т. 61. № 10. С. 1883–1932.
24. *Holland H.L.* // *Adv. Appl. Microbiol.* 1997. V. 44. P. 125–165.
25. *Preisig C.L., Laakso J.A., Mocek U.M., Wang P.T., Baez J., Byng G.* // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. № 3. P. 350–356.
26. *Fokina V., Susina N., Arinbasarova A.Y., Zubov A.L., Lozinsky V.I., Koshcheenko K.A.* // *Immobilized Cells: Basics and Applications* / Ed. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, J. Tramper. Amsterdam: Elsevier Sci., 1996. P. 90–97.
27. *Фокина В.В., Аринбасарова А.Ю., Зубов А.Л., Лозинский В.И., Кощеенко К.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1995. Т. 31. № 2. С. 213–219.
28. *Nedovic V., Willaert R.* // *Application of Cell Immobilisation Biotechnology. Ser. Focus on Biotechnology.* Berlin–Heidelberg–New York: Springer, 2005. V. 8B. P. 573.
29. *Lozinsky V.I., Faleev N.G., Zubov A.L., Ruvinov S.B., Antonova T.A., Vainerman E.S., Belikov V.M., Rogozhin S.V.* // *Biotechnol. Lett.* 1989. V. 11. № 1. P. 43–48.
30. *Алебян Г.П., Арзуманов Е.Н., Мкртчян М.Б., Тозалакян П.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // *Биотехнология.* 1990. № 6. С. 29–32.
31. *Ariga O., Sano T., Sano Y.* // *Ferment. Bioeng.* 1993. V. 76. № 3. P. 203–206.
32. *Bielecki S., Bolek R.* // *Immobilized Cells: Basics and Applications* / Ed. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper. Amsterdam: Elsevier Sci., 1996. P. 472–478.

Transformation of Δ^4 -3-Ketosteroids by Free and Immobilized Cells of *Rhodococcus erythropolis* Actinobacterium

N. V. Karpova^a, V. A. Andryushina^a, V. V. Yaderetz^a, A. V. Druzhinina^a, T. S. Stytsenko^a,
B. L. Shaskol'skiy^b, V. I. Lozinsky^b, Luu Duc Huy^c, and N. E. Voishvillo^a

^a *Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia*
e-mail: andrushina@rambler.ru

^b *Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991*

^c *Laboratory of Steroids, Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Sciences and Technology, Hanoi 7/1*

Received August 16, 2010

Abstract—9 α -Hydroxy derivatives were prepared from 11 steroids of androstane and pregnane series using *Rhodococcus erythropolis* VKPM Ac-1740 culture with 0.5–20 g/l substrate concentration in the reaction mixture. 9 α -Monohydroxylation proceeded regardless of the substituent structure at C17. However, the structure of the steroid molecule influenced the time of complete conversion of the substrate and the yield of the transformation product. 9 α -Hydroxy-androstenedione was obtained in 35 h in a yield of 85% when the maximum concentration of androstenedione (AD) was 10 g/l. 9 α -Hydroxy-AD was also formed by the actinobacterium cells entrapped in poly(vinyl alcohol) cryogel beads. Nine successive transformation cycles were carried out using immobilized cells at 4.0 g/l concentration of AD in the medium. The yield of 9 α -hydroxy-AD formed during six cycles (from two to eight with the duration of each cycle for 22–24 h) was 98%.