

УДК 547.92

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СТЕРОИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ НА НАПРАВЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ГРИБОМ *Curvularia lunata*

© 2013 г. В. А. Андриюшина, В. В. Ядерец, Т. С. Стыщенко, А. В. Дружинина, Н. Е. Войшвилло

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: andryushina@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.11.2012 г.

Идентифицированы с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии, а также сравнением со стандартными образцами, основные и побочные продукты гидроксилирования мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 четырнадцати Δ^4 -3-кетостероидов рядов эстрана, андростана и прегнана и шести их Δ^5 -3 β -гидроксиданалогов. Полученные экспериментальные данные рассмотрены с точки зрения триангулярной модели субстрат-ферментного взаимодействия.

Выявлена зависимость направления гидроксилирования стероидной молекулы и ориентации гидроксигрупп от структуры исходного субстрата.

DOI: 10.7868/S055510991304003X

За период, прошедший после сообщения [1] в 1952 г. Петерсоном и Мюрреем о наличии у плесневого гриба *Rhizopus arrhizus* способности осуществлять 11α -гидроксилирование стероидов, была осуществлена микробная трансформация соединений ряда эстрана, андростана и прегнана. Было установлено, что микроскопические грибы всех классов могут вводить гидроксигруппы почти во все положения стероидной молекулы, причем более 300 штаммов проявляют способность к 7α - и 11α -гидроксилированию. Около 100 видов образуют смесь 11α - и 11β -гидроксисоединений, однако только единицы способны селективно вводить гидроксигруппы в 8β - и 11β -положения, доступ к которым, возможно, затруднен 18β - и 19β -метильными группами [2–8].

Вводить в стероиды 11β -гидроксигруппу способны штаммы рода *Curvularia*, в частности вид *C. lunata*, с помощью которого получен большой набор 11β -гидроксистероидов ряда андростана, прегнана и эстрана [3–6, 9–15]. Особенность гриба *C. lunata* заключается в осуществлении, главным образом, аксиального гидроксилирования. В зависимости от структуры Δ^4 -3-кетостероидов *C. lunata* преимущественно вводит гидроксигруппы в 11β - или 14α -, а также в 9α -положения молекулы. Побочные гидроксисоединения могут появляться вследствие 6β - и 7α -гидроксилирования, а также восстановления 17- и 20-кетогрупп [2–6].

Несмотря на большое количество данных по трансформации различных стероидов микроорганизмами, зависимость между строением стероидной молекулы и направлением ее гидроксилирования еще недостаточно изучена. Группой ученых

Оксфордского университета под руководством проф. Джонса на примере 5α -андростанов была разработана триангулярная модель субстрат-ферментного взаимодействия [16], основанная на предположении о том, что гидроксилирование стероидного субстрата в различные положения осуществляется одним и тем же ферментом [17].

Согласно этой модели, кислородные группы стероида при C3 и C17 (или C20) выполняют функцию связывания стероидного субстрата с ферментом, а направление вводимой в молекулу гидроксигруппы зависит от ориентации стероида по отношению к ферменту. Рассматриваются 4 теоретически возможные ориентации: **A** – нормальная (normal), **B** – нормальная перевернутая (normal inverted), **C** – альтернативная (reverse), **D** – альтернативная перевернутая (reverse inverted) (рис. 1). Ориентации **A** и **C** могут быть получены друг из друга вращением молекулы вокруг оси, перпендикулярной плоскости ее колец, а ориентации **B** и **D** вращением молекулы вокруг оси C3-C17 на 180° .

Модель Джонса учитывает, что замена водорода на гидроксильную группу в любой ориентации происходит с сохранением конфигурации. Гидроксилирование стероидов в 11α -положение в этой модели рассматривается как трансформация в ориентации **A** [16, 18]. На рис. 1 видно, что в альтернативной ориентации **C** наиболее вероятно гидроксилирование в 7α -положение, что было подтверждено экспериментально на 5α -Н-андростанах. При трансформации 16β -гидрокси-3-кетандростана (в ориентации **A**) и его 3β -гидроксиданалога (в ориентации **C**) соответствующие

11 α - и 7 α -гидроксипроизводные были получены с выходом 98 и 90% с помощью культуры *Rhizopus nigricans* [19] (рис. 2). С этой гипотезой согласуются также результаты ряда работ по гидроксильрованию микроскопическими грибами Δ^4 -3-кетостероидов [4–6, 8, 9, 18].

Цель работы – трансформация с помощью штамма *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 стероидов Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксириядов с различными заместителями в кольце D и интерпретация экспериментальных данных с точки зрения триангулярной модели субстрат-ферментного взаимодействия, разработанной для 5 α -Н-стероидов.

МЕТОДИКА

Стероиды. Субстратами для микробиологической трансформации служили: эстр-4-ен-17 β -ол-3-он (нортестостерон – **1**), андрост-4-ен-17 β -ол-3-он (тестостерон – **2**), андрост-4-ен-3,17-дион (андростендион – **3**), андроста-1,4-диен-3,17-дион (андростадиендион – **4**), андрост-4-ен-9 α -ол-3,17-дион (9 α -гидроксиандростендион – **5**), 17 α -метил-андрост-4-ен-17 β -ол-3-он (17 α -метилтестостерон – **6**), андроста-4,6-диен-17 β -ол-3-он-17 α -кислоты пропионовой γ -лактон (спироидиен – **7**), прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон – **8**), прегн-4-ен-17 α -ол-3,20-дион (17 α -гидроксипрогестерон – **9**), 16 α ,17 α -оксидо-прегн-4-ен-3,20-дион (оксидо-прогестерон – **10**), прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (кортексолон – **11**), 6 α -метил-прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (6 α -метилкортексолон – **12**), 16 α -метил-прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (16 α -метилкортексолон – **13**), 20 α -метил-прегна-1,4-диен-21 α -ол-3-он (**14**) и 3 β -гидроксианалоги **2**, **3**, **6**, **8**, **10**, **11** – андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол (андростендиол – **2a**), андрост-5-ен-3 β -ол-17-он (андростенолон – **3a**), 17 α -метил-андрост-5-ен-17 β -ол-3-он (**6a**), прегн-5-ен-3 β -ол-20-он (прегненолон – **8a**), 16 α ,17 α -оксидо-прегн-5-ен-3 β -ол-20-он (оксидопрегненолон – **10a**), прегн-5-ен-3 β ,17 α ,21-триол-20-он (вещество “R” – **11a**) (рис. 2 и 3).

Микроорганизм и его культивирование. Культуру *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 хранили на скошенной агаровой среде, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4.0, солодовый экстракт – 10.0, глюкозу – 10.0, агар – 25.0, pH 6.2–6.8. Выращивание гриба и трансформацию соединений проводили на качалке при скорости перемешивания 220 об/мин и температуре $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Мицелий, предназначенный для трансформации, выращивали в 2 стадии. Споры гриба в возрасте 14–20 сут смывали со скошенного агара и переносили в 100 мл жидкой среды в конических колбах объемом 750 мл, содержащей (г/л): пептон – 5.0, дрожжевой экстракт – 5.0, соевая мука – 10.0, глюкоза – 20.0, KH_2PO_4 – 2.0, pH 5.4–5.6. Через

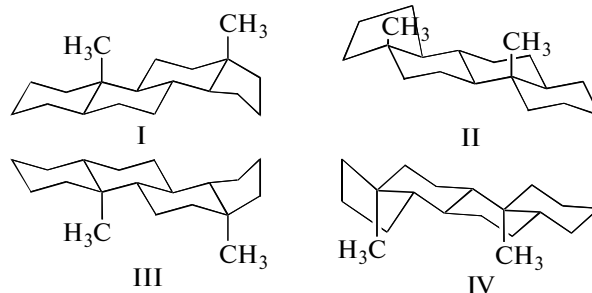


Рис. 1. Ориентации стероидной молекулы. I – нормальная, II – альтернативная, III – нормальная перевернутая, IV – альтернативная перевернутая.

3 сут полученную биомассу в количестве 10 об. % переносили в среду, содержащую (г/л): сахара – 30.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaNO_3 – 2.0, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 3.0, K_2HPO_4 – 1.0, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, рост в которой продолжался 20–24 ч. Мицелий отделяли от среды, промывали 0.7 М фосфатным буфером и использовали для трансформации.

Трансформация. Трансформация стероидов осуществлялась в 70 мл 0.7 М фосфатного буфера (pH 6.0–6.3), содержащего стероид, который вносили в буфер в зависимости от гидрофобности в количестве 1–15 г/л в виде мелкодисперсного порошка либо в виде водорастворимого комплекса с метил- или гидроксипропил- β -циклодекстрином. Отмытую от питательной среды биомассу вносили в буфер в количестве 10 г/л (сухой массы).

Через определенные интервалы времени инкубации отбирали пробы реакционной смеси. При наличии в пробах остаточного субстрата инкубацию продлевали до 48 ч. Стероиды извлекали этилацетатом, качественную оценку содержания продуктов трансформации в пробах проводили методом ТСХ. В конце трансформации мицелий отделяли от реакционной жидкости и экстрагировали отдельно биомассу и жидкую фазу. В случае присутствия стероидов в мицелии экстракты объединяли. Выделение основных гидроксистероидов осуществляли аналогично [14]. Побочные продукты трансформации, образовавшиеся в количестве менее 5%, не выделяли.

Для оценки количественного содержания стероидов в экстракте использовали методы препаративной ТСХ, ВЭЖХ и ^1H ПМР. Для ТСХ использовали стеклянные пластинки фирмы “Merck” (Германия). Структура полученных соединений установлена с помощью ^1H ПМР-спектроскопии и сравнением с известными образцами. Данные представлены в табл. 1 и 2.

Приборы. Спектры ПМР снимали на спектрометре АС200-31 (“Bruker”, Германия), масс-спектры – на масс-спектрометре MS-30 (“Kratos”, Великобритания).

Таблица 1. ¹H ПМР-спектры продуктов гидроксирования Δ⁴-3-кетостероидов (CDCl₃, δ)

Стероиды	18-Н	19-Н	4-Н	СНОН	Другие сигналы
14α-гидрокси-3*	0.91 с	1.15 с	5.63 с	4.30 с (14α-ОН)	
14α-гидрокси-4	1.06 с	1.25 с	6.077 т		6.23 кд J = 12 Гц, J = 1.8 Гц (2-Н) 7.033 д J = 10 Гц (1-Н)
9α, 14α-дигидрокси-3*	1.05 с	1.37 с	5.85 д	3.12 с (9α-ОН) 4.08 с (14α-ОН)	
11β, 14α-дигидрокси-3*	0.91 с	1.144 с	5.72 д J = 1.4 Гц	4.69 с (14α-ОН) 5.59 с (11β-ОН)	4.24 с (11α-Н)
11β-гидрокси-1	0.82 с	—	5.78 с	—	3.62 м (17-Н), 4.27 м (11α-Н)
11β-гидрокси-2	1.01 с	1.43 с	5.65 с		3.58 кд J = 8.8 Гц, J = 7.5 Гц (17α-Н) 4.36 м ΣJ = 9.4 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-6	0.89 с	1.13 с	5.65 с		1.238 с (17-Н), 4.09 кд (11α-Н)
7α-гидрокси-6	0.89 с	1.225 с	5.79 с		1.196 с (17-CH ₃) 3.95 кд (7β-Н)
7β-гидрокси-6	0.91 с	1.22 с	5.71 с		1.312 с (17-CH ₃) 4.04 кд (7α-Н)
11β, 17α-дигидрокси-8	1.01 с	1.41 с	5.66 с	2.72 уш. с (17-ОН)	2.27 с (21-Н), 4.45 м J = 3.1 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-8	0.99 с	1.43 с	5.66 с		2.1 с (21-Н) 3.16 м ΣJ = 12 Гц (17-Н)
7α-гидрокси-8	0.73 с	1.19 с	5.79 с		4.27 кд J = 3 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-7*	1.25 с	1.35 с	6.05 с	4.55 с (11β-ОН)	2.1 с (21-Н) 3.16 м (17-Н) 4.39 м (7β-Н)
11β-гидрокси-10	1.32 с	1.43 с	5.65 д J = 1.5 Гц		3.43 кд (7β-Н), 3.6 д (6α-Н) J _{6,7} = 3.54 Гц 4.4 кд ΣJ = 9.1 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-14	0.86 с	1.35 с	5.8 с		2.05 с (21-Н), 3.77 с (16-Н) 4.40 кд ΣJ = 8.2 Гц (11α-Н)
7β-гидрокси-14	1.02 с	1.24 с	6.1 д		4.15 кд (11α-Н), 6.03 д(2-Н), 7.24 д(1-Н)
14α-гидрокси-11*	0.71 с	1.02 с	5.81 с	4.01 м (14α-ОН)	4.2т J = 15.5 Гц (7-Н), 6.2д (2-Н), 7.05м (1-Н) 4.35 м (21-Н)
14α-гидрокси-13	0.75 с	1.15 с	5.73 с		1.18 с (3-Н), 4.45 м (21-Н)

* ПМР-спектры сняты в ДМСО, остальные – в CDCl₃.

Таблица 2. ^1H ПМР-спектры продуктов гидроксирования Δ^5 - 3β -гидрокси-стероидов (CDCl_3 , δ)

Δ^5 - 3β -гидроксистероид	18-Н	19-Н	3-Н β	6-Н	7-Н β	Другие сигналы
7 α -гидрокси- 2a *	0.61 с	0.89 с	3.27 т	5.4 кд	3.57 т	3.42с (17 α -Н)
7 α -гидрокси- 3a	0.86 с	0.99 с	3.55 т	5.6 кд J = 5.3	3.94 т	1.65 т (8-Н)
7 α -гидрокси- 6a	0.81 с	1.05 с	3.52 т	5.61 д	4.15 т	1.2 с (17-CH $_3$)
11 β -гидрокси- 8a **	0.73 с	1.14 с	3.38 т	5.44 кд	—	4.03 д (11 α -Н), 2.02 с (21-Н)
7 α ,11 β -дигидрокси- 8a	0.87 с	1.25 с	3.55 т	5.5 д	3.96 т	4.45 т (11 α -Н), 2.3 (4-Н), 2.12 с (21-Н)
7 α -гидрокси- 10a **	0.88 с	0.92 с	3.38 т	5.43 кв	3.61 т	1.92 с (21-Н)
7 α -гидрокси- 11a	0.47 с	0.87 с	3.35 т	4.41 д	3.59 т	4.35 м (21-Н) 5.14 с (17-ОН)
11 β -гидрокси- 11a *	0.71 с	1.17 с	3.25 т	5.12 уш. с	—	4.27 т (11 α -Н) 4.15 м (21-Н) 5.15 с (17-ОН)

* ДМСО, ** ДМСО + CDCl_3 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 3 приведены результаты гидроксирования мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 14 Δ^4 -3-кетостероидов рядов эстрана, андростана и прегнана (**1–14**), структуры которых представлены на рис. 2. В табл. 4 представлены результаты трансформации 6 Δ^5 - 3β -гидроксианалогов соединений **2**, **3**, **6**, **8**, **10**, **11** (рис. 3).

Для того чтобы избежать влияния компонентов ростовой среды на ход трансформации всех указанных соединений, использован мицелий, выращенный в отсутствие стероидных индукторов и отмытый от среды в конце фазы логарифмического роста. Длительность инкубации стероидов с мицелием составляла не более 48 ч, в основном 20–24 ч. При более длительном процессе накапливались продукты деструкции субстрата. В табл. 3 и 4 показано, что большинство стероидов трансформировали в солюбилизованном виде с помощью метил- либо гидроксипропил-циклодекстрина.

В предыдущей работе [14] нами было установлено отсутствие влияния используемых циклодекстринов на направление основных и побочных реакций гидроксирования. Не оказывая влияния на направление гидроксирования, циклодекстрины ускоряли процесс введения основной гидроксигруппы, и тем самым препятствовали образованию побочных продуктов из соединений **2–4**, **9**, **8a**. Например, конверсия солюбилизованного тестостерона **2** в 11 β -гидрокси-**2** при нагрузке субстрата 4 г/л заканчивалась с выходом продукта 70% без образования побочных соединений (табл. 3). Но трансформация **2** в виде микрокристаллов при нагрузке 2 г/л заканчивалась

образованием не более 30% 11 β -гидрокси-**2** и с примесью 10% побочного 6 β ,11 β -гидрокси-**2** [14]. Также в присутствии модифицированных циклодекстринов с высокой скоростью и практически без образования побочных гидроксипродуктов протекала трансформация Δ^5 - 3β -гидроксистероидов **2a** и **3a** (табл. 4).

В табл. 3 показано, что гидроксирование Δ^4 -3-кетостероидов происходило преимущественно в 11 β -положение за исключением 3,17-дикетоандростанов **3**, **4**, **5**, трансформация которых завершилась образованием 14 α -гидроксипроизводных и в небольшом количестве побочных продуктов. В работах Доновой с соавт. сообщается, что при трансформации **3**, **4**, **5** с помощью грибов *C. lunata* ВКМ F-644 или *Gongronella butleri* ВКМ F-1033 образуется до 7% побочных 6 α -, 6 β -, 7 α - и 7 β -гидроксистероидов [13, 20]. Отсутствие 19-метильной группы в **1** не влияло на результат его гидроксирования. Конверсия нортестостерона **1** и тестостерона **2** в 11 β -гидрокси-**1** и 11 β -гидрокси-**2** с помощью *C. lunata* ВКПМ F-681 составила более 80%. Эти продукты выделены с выходом 65 и 62% соответственно. В работе с *C. lunata* NRRL 2380 [9] показано, что наличие $\Delta^{9,10}$ -двойной связи в **1** также не отражается на способности штамма к 11 β -гидроксированию.

Данные трансформаций **1–14** (табл. 3, 5) свидетельствуют о значительном влиянии кислородсодержащих заместителей в кольцах А и Д на состав продуктов гидроксирования. Наличие в **6**, **7** и **14** при С17 заместителей не природного происхождения способствовало нехарактерному для *C. lunata* экваториальному гидроксированию в 6 α - и 7 β -положения и образованию в случае **6** по-

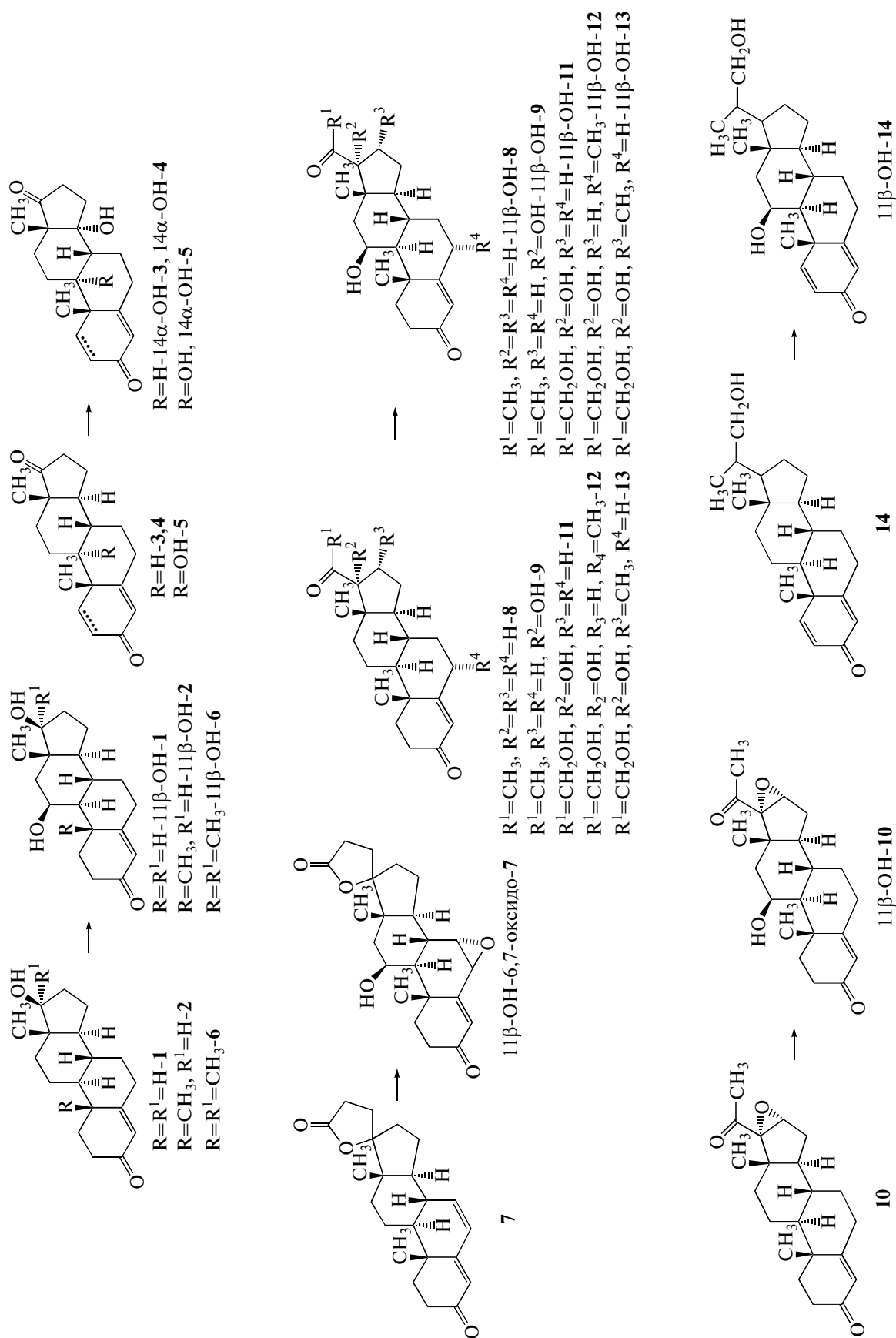


Рис. 2. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетостероидов мицелием *Sarvalaria lanata* ВКПМ F-981 (номер соединения см. в методике).

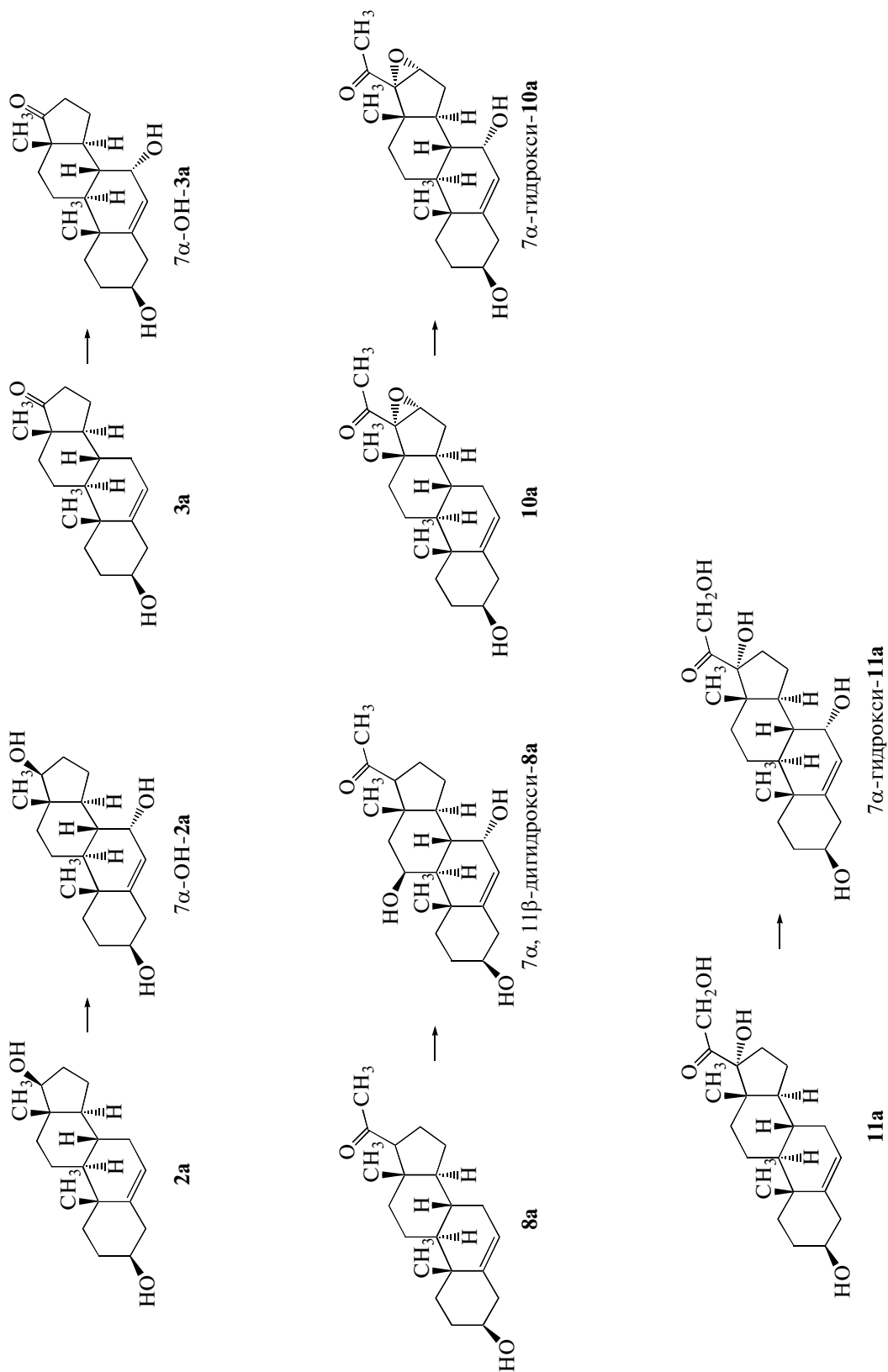


Рис. 3. Гидроксилирование Δ^5 -3 β -гидроксистероидов *S. litata* ВКПМ F-981 (номер соединения см. в методике).

Таблица 3. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетостероидов мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 (структуру см. рис. 3)

Стероид			Продукт трансформации			
брутто формула	№	Нагрузка, г/л	основной	выход, %	побочный	выход, %
Андростаны						
$C_{18}H_{26}O_2$	1	2.0	11 β -гидрокси- 1	65	Не идентифицирован	—
$C_{19}H_{28}O_2$	2	4.0*	11 β -гидрокси- 2	62	—	—
$C_{19}H_{26}O_2$	3	6.0*	14 α -гидрокси- 3	58	11 β -гидрокси- 2	10
$C_{19}H_{24}O_2$	4	3.0*	14 α -гидрокси- 4	69	17-CO \rightarrow 17 β -ОН	5
$C_{19}H_{26}O_3$	5	2.0	9 α ,14 α -дигидрокси- 3	85	—	—
$C_{20}H_{30}O_2$	6	2.0*	11 β -гидрокси- 6	25	7 β -гидрокси- 6	20
			7 α -гидрокси- 6	30		
$C_{22}H_{28}O_3$	7	1.0*	11 β -гидрокси-6,7 α -эпоксид- 7	30	6 α ,7-эпоксид- 7	25
Прегнаны						
$C_{21}H_{30}O_2$	8	2.0*	11 β -гидрокси- 8	40	6 β -гидрокси- 8	10
			7 α -гидрокси- 8	40		
$C_{21}H_{30}O_3$	9	5.0*	11 β ,17 α -дигидрокси- 8	78	Не идентифицирован	<5%
$C_{21}H_{28}O_3$	10	1.0	11 β -гидрокси- 10	49	11 β ,14 α -дигидрокси- 10	10
$C_{21}H_{30}O_4$	11	10.0*	11 β -гидрокси- 11	56	14 α -гидрокси- 11	22
$C_{22}H_{32}O_4$	12	2.5	11 β -гидрокси- 12	50	14 α -гидрокси- 12	<5%
$C_{22}H_{32}O_4$	13	10.0*	11 β -гидрокси- 13	50	14 α -гидрокси- 13	12
$C_{22}H_{32}O_2$	14	2.0*	11 β -гидрокси- 14	43	7 β -гидрокси- 14	25
					7 β ,11 β -дигидрокси- 14 ГМПД	15

* Внесение стероида с использованием метил- или гидроксипропил- β -циклодекстрина.**Таблица 4.** Гидроксилирование Δ^5 -3 β -гидроксианалогов **2, 3, 6, 8, 10, 11** мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 (структуры см. рис. 3)

Стероид*			Продукт трансформации, выход			
брутто-формула	№, (см. табл. 1)	нагрузка, г/л	основной, %	побочный, %		
Андростаны						
$C_{19}H_{27}O_2$	3a	5.0	7 α -гидрокси- 3a	75–80	17-CO \rightarrow 17 β -ОН	<5%
$C_{19}H_{29}O_2$	2a	5.0	7 α -гидрокси- 2a	70–80	Не идентифицирован	—
$C_{20}H_{32}O_2$	6a	2.0	7 α -гидрокси- 6a	40–45	Не идентифицирован	—
Прегнаны						
$C_{21}H_{33}O_2$	8a	2.0	7 α ,11 β -дигидрокси- 8a	69	Не идентифицирован	—
$C_{21}H_{31}O_3$	10a	2.0	7 α -гидрокси- 10a	75	Не идентифицирован	—
$C_{21}H_{33}O_4$	11a	2.0	7 α -гидрокси- 11a	30	11 β -гидрокси- 11a	25

* Внесение стероида с использованием метил- β -циклодекстрина.

бочных соединений в количестве, превышающем количество 11 β -гидрокси-**6**.

Введение гидроксила в 11 β -положение Δ^4 -3-кетостероидов ряда прегнана происходило в первую очередь как основная реакция, которая протекала, согласно модели Джонса, в ориентации **D**. Как побочная реакция наблюдалось гидроксилирование в 6 β -, 7 α -, 7 β - и 14 α -положения, причем побочные продукты накапливались при

высоких нагрузках субстратов, для полной конверсии которых требовалось не менее 48 ч инкубации. Исключение составил прогестерон **8**, трансформация которого протекала с одновременным образованием моно-11 β - и 7 α -гидроксипроизводных в равном количестве — 40% (табл. 3). В отличие от 3,17-дикетоандростанов **3–5**, гидроксилирование которых происходило в ориентации **C** и основными продуктами трансформации были 14 α -гидроксипроизводные, у 3-кетопрегнанов **10–13** эта

Таблица 5. Изменение направления гидроксирования в зависимости от характера заместителей в кольцах А и Д стероидов, трансформируемых с помощью *C. lunata*

Шифр стероида, ссылка	Кислородсодержащий заместитель в кольцах А и Д		Положения вводимой гидроксигруппы,	
	при С3	при С17	основное	побочное
1	=O	–ОН	11β	14α
Δ ^{9,10} - 1 [3, 9]	=O	–ОН	11β	Н.д.
2	=O	–ОН	11β	6β, 11β
3	=O	=O	14α	11β, 17β
4	=O	=O	14α	Сл.
5	=	=O	14α	Н.д.
6	=O	–ОН	11β	7α + 7β
7	=O	–ОСО(СН) ₂	11β	6α
8	=O	–СОСН ₃	11β + 7α	6β
19-нор- 8 [3]	=O	–СОСН ₃	11β	Н.д.
Δ ^{8,9} - 8 [9]	=O	–СОСН ₃	9α, 14α	11β
9	=O	–ОН, –СОСН ₃	11β	Сл.
19-нор- 9 [3]	=O	–ОН, –СОСН ₃	11β	Н.д.
10	=O	=O, –СОСН ₃	11β	11β, 14α
11	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
Δ ^{9,11} - 11 [20]	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	14α	11β
12	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
Δ ^{1,2} - 12 [15]	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	Н.д.
13	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
14	=O	–СН(СН ₃)СН ₂ ОН	11β	7β + 7β, 11β
2a	–ОН	–ОН	7α	Сл.
3a	–ОН	=O	7α	Сл.
6a	–ОН	–ОН	7α	Н.д.
8a	–ОН	–СОСН ₃	7α, 11β	Н.д.
10a	–ОН	=O, –СОСН ₃	7α	Н.д.
11a	–ОН	–ОН, –СОСН ₂ ОН	7α	11β

Н.д. – данные отсутствуют, Сл. – следы неидентифицированных продуктов.

реакция протекала как побочная, и отсутствовала у 3-гидроксисоединений (табл. 3, 4).

При переходе от Δ⁴-3-кетостероидов к Δ⁵-3β-гидроксистероидам вместо основного 11β-гидроксирования (табл. 5) протекало 7α-гидроксирование в ориентации С с образованием из Δ⁵-3β-гидроксианалогов **2a**, **3a**, **6a**, **10a**, **11a** моно-7α-гидроксипроизводных с выходом до 80%. Исключением оказались соединения **8a** и **11a**. Из прегненолона **8a** был получен 7α, 11β-дигидрокси-**8a**, а при инкубации **11a** накопление 7α-гидрокси-**7a** происходило одновременно с образованием 11β-гидрокси-**11a** (табл. 4).

Результаты трансформации Δ⁴-3-кетостероидов **6** и **8**, а также Δ⁵-3β-гидроксистероидов **8a** и **11a**, 7α- и 11β-гидроксирование которых про-

исходило практически с равной интенсивностью и одинаковым выходом гидроксипродуктов, противоречат гипотезе, согласно которой введение 11β-гидроксила в молекулу стероида затруднено вследствие экранирования 11β-водорода углеродными группами при С10 и С13. Они также свидетельствуют о том, что существенную роль в изменении направления гидроксирования с 11α/β- на 7α- играет не изменение места двойной связи, а замена 3-СО-группы на 3-ОН-группу, что наблюдалось и в работе с 5α-Н-стероидами [19].

Возможно, что выбор ориентации определяется относительным сродством 3-17(20)-функций стероида к соответствующим участкам фермента и их ролью в процессе трансформации. Карбонил функционирует как акцептор для водородных свя-

зей, гидроксил – и как донор и как акцептор. Наличие и характер заместителей при C17 определяет доступность функций C17(20) для фермента. Это предположение подтверждают данные трансформации андростанов **2**, **3** и прегнанов **8–11** культурой *Corynespora cassicola* [8], проявляющей способность к 8β-гидроксилированию. Гриб вводил 8β-гидроксигруппу в соединения **3**, **9**, **10**, **11**, однако из **2** и **8** образовал 9α-гидроксипроизводные и не трансформировал 17-ацетокси-**8**.

Авторы указанной работы также предполагают, что выбор места гидроксирования в одной и той же ориентации (например, в случае с *C. lunata*, это – 7α-, 9α- или 14-гидроксилирование в ориентации C), может определяться различием в характере фиксации с ферментом заместителей при C3 и C17. В определенной ориентации заместитель при C17 имеет жесткую фиксацию, и молекула как бы “раскачивается” с небольшой амплитудой, позволяя C3-заместителю зафиксировать молекулу в оптимальной для гидроксирования позиции.

Сравнивая данные, полученные при трансформации стероидов мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981, с литературными, можно сделать вывод о том, что направление реакции определяется не только структурой молекулы, но и таксономическим положением микроорганизма-трансформатора. Вероятно, что не только структура, но и ряд других, пока не установленных нами факторов, также являются существенными в определении основной и побочных реакций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murray H.C., Peterson D.H. Patent US. 1952. № 2602769.
- Capek A., Hanc O., Tadra M. // Microbial Transformation of Steroids. Prague: Academia Publishing House of Czechoslovak Academy of Science, 1966. 250 p.
- Charney W., Herzog H.L. // Microbial Transformation of Steroids. New York: Academic Press, 1967. 728 p.
- Axrem A.A., Turov Yu.A. // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. 526 с.
- Smith L.L. // Terpenoids and Steroids / Ed. K.H. Overton. New York: Acad. Press, 1974. V. 4. P. 394–530.
- Mahato S.B., Garai S. // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
- Lobastova T.G., Gulevskaya A.S., Sukhodolskaya G.V., Turchin K.F., Donova M.V. // Biocatal. Biotransform. 2007. V. 25. № 6. P. 434–442.
- Hunter A.C., Rymer S.-J., Dedi C., Dodd H.T., Nwozor Q.C., Moghimi S.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1811. № 12. P. 1054–1061.
- Holland H.L., Riemland E. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 5. P. 1121–1126.
- Турута А.М., Камерницкий А.В., Богданов В.С., Комарова Г.В., Коцеев К.А. // Хим.-фарм. ж. 1990. Т. 24. № 6. С. 52–55.
- Умнова Э.Ф., Рыжкова В.М., Воробьева Л.И. // Хим.-фарм. ж. 1990. Т. 24. С. 56–58.
- Chosson H., Vidal H., Aumelas A., Couderc F. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 83. № 1. P. 17–22.
- Колеров В.В., Шутов А.А., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Донова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 212–220.
- Андрюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценок Т.С., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 50–57.
- Perlman B.A., White M.J., Gilbert G. US Patent. 2004. № 6. P. 828 120.
- Jones E.R.H. // Pure Appl. Chem. 1973. V. 33. № 1. P. 39–52.
- Brannon D.R., Parrish F.W., Wiley B.J., Long L. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. № 5. P. 1521.
- Holland H.L. // Steroids. 1999. V. 64. № 2. P. 178–186.
- Chambers V.E.M., Denny W.A., Evans J.M., Jones E.R.H., Kasal A., Meakins G.D., Pragnell J. // J. Chem Soc. Perkin I. 1973. № 14. P. 1500–1511.
- Kollerov V.V., Shutov A.A., Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V. // J. Mol. Catal. B: Enz. 2008. V. 55. № 1. P. 61–68.

Effect of the Steroid Molecule Structure on the Direction of Its Hydroxylation by the Fungus *Curvularia lunata*

V. A. Andryushina, V. V. Yaderets, T. S. Stytsenko, A. V. Druzhinina, and N. E. Voishvillo

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

e-mail: andryushina@rambler.ru

Received November 8, 2012

Abstract—The main and side products of hydroxylation by the *C. lunata* VKPM F-981 mycelium of fourteen Δ^4 -3-ketosteroids of the estrane, androstane, and pregnane series and six of their Δ^5 -3 β -hydroxy analogues were identified by ^1H PMR spectroscopy and comparison with standard samples. The obtained experimental data are considered in terms of the triangular model of the enzyme–substrate interaction. The dependence of the direction of hydroxylation of steroid molecules and the orientation of hydroxy groups on the structure of the initial substrate was revealed.