

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ СТЕРОИДОВ

*Л. М. Коган*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	581
II. Типы микробиологических превращений стероидов . . . . .	583
1. Введение гидроксильной группы . . . . .	583
2. Эпоксидирование и раскрытие эпоксидного кольца . . . . .	591
3. Введение кетогруппы . . . . .	592
4. Окисление гидроксильной группы . . . . .	592
5. Дегидрирование стероидного скелета . . . . .	593
6. Реакции восстановления . . . . .	597
7. Реакции гидролиза . . . . .	598
8. Реакции, связанные с разрывом углерод-углеродных связей . . . . .	598
III. О некоторых аспектах механизма микробиологических превращений стероидов . . . . .	600
IV. Применение микробиологических реакций . . . . .	603

## I. ВВЕДЕНИЕ

В наше время вряд ли придется убеждать кого-либо в важности роли микроорганизмов для развития и поддержания жизни на Земле. И вряд ли нужно говорить химикам о значении микробиологических процессов в современной промышленности — достаточно вспомнить производство антибиотиков. В нашем обзоре мы затрагиваем чрезвычайно узкую область, связанную с жизнедеятельностью микроорганизмов, но мы увидим, что этой маленькой области уделяется весьма большое внимание химиками всего мира.

Предлагаемый обзор превращений стероидов под действием микроорганизмов не исчерзывающий. Задача данного обзора — не вдаваясь в излишние подробности, дать представление о возможностях сотрудничества химика и микробиолога.

Превращение какого-либо субстрата под действием микроорганизмов происходит благодаря ферментам, образуемым каждой клеткой микроорганизма в процессе ее жизнедеятельности. Такие микробиологические реакции как спиртовое, молочнокислое брожение используются уже с незапамятных времен. Связь этих процессов с жизнедеятельностью живых организмов впервые была отмечена Шванном в 30-х годах XIX столетия. Пастер ввел для микробиологических реакций, сопровождающихся выделением газа, термин «ферментация», впоследствии распространенный на другие микробиологические реакции.

Уже более 20 лет назад было замечено, что некоторые микроорганизмы способны осуществлять различные превращения стероидов. Ранние работы, связанные с именами Мамоли и Верчеллоне<sup>1, 2, 3</sup>, касались гидрирования кетогруппы, сопряженной с двойной связью, либо дегидрирования вторичной гидроксильной группы. В 1948 г. Крамли и Хорват<sup>4</sup> впервые осуществили введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем. Но только после работы Питерсона<sup>5</sup>, получившего 11- $\alpha$ -оксипрогестерон (I) из прогестерона (II) при ферментации последнего с культурой *Rhizopus nigricans* с выходом 10%, микробиологические превращения стероидов привлекали широкое внимание.

Микробиологические превращения стероидов весьма разнообразны по своему характеру. К ним относятся: введение гидроксильной группы, образование кетогруппы, образование и расщепление эпоксидов, гидрирование и легчадрирование и другие реакции. Несмотря на это разнообразие, методы проведения микробиологических реакций довольно единообразны. При поисковых работах, где не требуется или не имеется возможности применять большие количества вещества, ограничиваются проведением реакции в колбах на качалках. Обычно ставят параллельно несколько колб. В наиболее часто применяемых колбах емкостью 750—1000 мл загрузка стероида составляет обычно 100—200 мг. Для загрузок порядка 1—2 г стероида применяют стеклянные ферментеры емкостью 10—20 л, представляющие собой сосуды, снабженные мешалками, термометрами, приспособлениями для загрузки, выгрузки, отбора проб, теплообменными элементами и, при необходимости, барботером для пропускания воздуха. В промышленности и на опытных установках употребляют стальные аппараты, оборудованные аналогичными приспособлениями.

Рассмотрим проведение процесса в стеклянном ферментере, принципиально не отличающемся от проведения реакции в колбе или стальном аппарате (это, конечно, не означает, что реакция в колбе может полностью моделировать реакцию в ферментере). Собранный ферментер стерилизуют и загружают в него стерильную питательную среду с внесенной в нее в стерильных условиях культурой микроорганизма. Особое внимание следует обращать на соблюдение строгой стерильности всех операций. Стерилизацию, в зависимости от объекта, осуществляют автоклавированием при температуре порядка 110—120°, работой в боксах, освещаемых бактерицидными лампами, выполнением операций по загрузке, отбору проб и т. п. в пламени газовой горелки. После загрузки (обычно передавливанием сжатым воздухом) питательной среды, зараженной культурой микроорганизма, требуется определенное время для развития культуры (от нескольких часов до нескольких суток). Стероид вносят растворенным в органическом растворителе — ацетоне, спирте, пропиленгликоле или диметилформамиде. В некоторых случаях вносят суспензию стероида, приготовленную осаждением его водой из спиртового или ацетонового раствора, что иногда положительно оказывается на выходе. Реакцию проводят при температуре, необходимой для нормального роста и жизнедеятельности микроорганизма, чаще всего 24—33°. Контроль за ходом реакции осуществляют при помощи бумажной хроматографии, либо микробиологическим методом. Большое применение для контроля за ходом микробиологических превращений стероидов получит хроматографирование на стеклянных пластинках в тонком слое адсорбента без связующего вещества<sup>6,7</sup>. Этот метод позволяет проводить разделение и обнаружение стероидов за 30—45 мин. вместо нескольких часов при хроматографировании на бумаге.

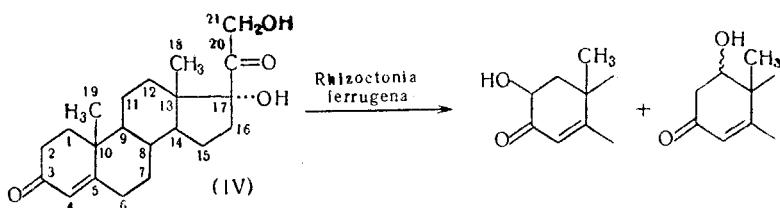
По окончании превращения реакционную массу экстрагируют несмешивающимся с водой органическим растворителем. Чаще всего для этой цели применяют хлороформ, дихлорэтан, этилацетат, хлористый метилен, иногда эфир. Иногда можно ограничиться экстракцией отфильтрованной культуральной жидкости. В некоторых случаях для более полного выделения стероидов имеет смысл перед экстракцией проводить гомогенизацию реакционной смеси. Экстракт концентрируют в вакууме и стероиды выделяют либо кристаллизацией, либо хроматографированием.

Недавно появилось сообщение о проведении микробиологического превращения стероидов при пропускании раствора стероида сквозь слой культуры микроорганизма на носителе<sup>8</sup>. Этот метод может позволить осуществить в промышленности непрерывный процесс.

## II. ТИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ СТЕРОИДОВ

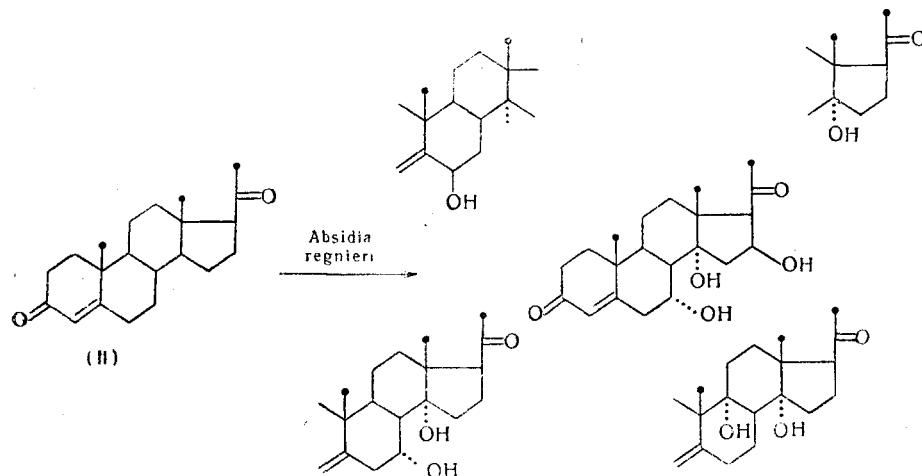
### 1. Введение гидроксильной группы

Введение гидроксильной группы у 1 и 2 углеродных атомов молекулы стероида проведено с различными стероидными субстратами — андростендионом<sup>9</sup> (III), веществом S Рейхштейна<sup>10</sup> (IV), 9 $\alpha$ -фторгидрокортизоном<sup>11</sup> (V) и другими стероидами при ферментации их с представителями таких микроорганизмов, как *Streptomyces*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*.

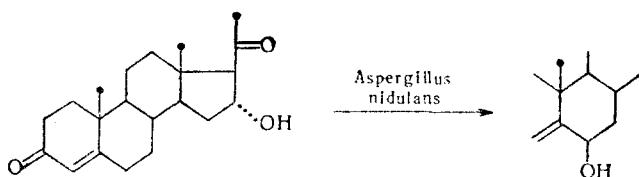


В тех случаях, когда была определена конфигурация введенного гидроксила, были получены 1 $\alpha$ - и 2 $\beta$ -изомеры. Выход продуктов 1- и 2-гидроксилирования обычно не превышает 10%. Гидроксилирование в 1 и 2 положение сопровождается различными побочными реакциями, осложняющими выделение и очистку продуктов превращения. Наиболее часто 1- и 2-гидроксилированию сопутствуют гидроксилирование у C<sub>11</sub>, C<sub>15</sub>, восстановление кетогруппы у C<sub>20</sub><sup>12</sup>.

Гидроксилирование в 6 $\beta$ -положение, осуществляющее преимущественно грибами, также редко протекает вполне избирательно. Например, при ферментации прогестерона (II) с культурой *Absidia regnieri*<sup>13</sup> получается пять продуктов превращения: \*

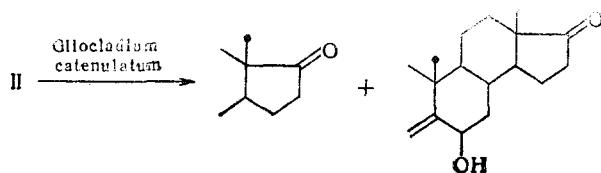


6 $\beta$ -моногидроксилирование происходит, если возможное место вступления второго гидроксила уже занято<sup>14</sup>:



\* Здесь и далее жирные точки обозначают метильные группы.

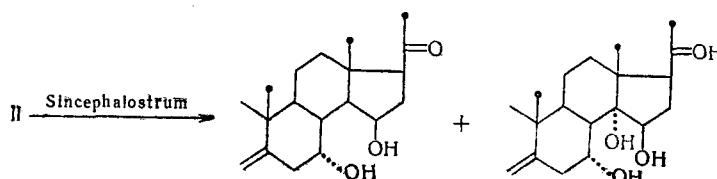
Питерсон приводит<sup>16</sup> случай, когда 6 $\beta$ -гидроксилирование сопровождается окислительным отщеплением боковой цепи:



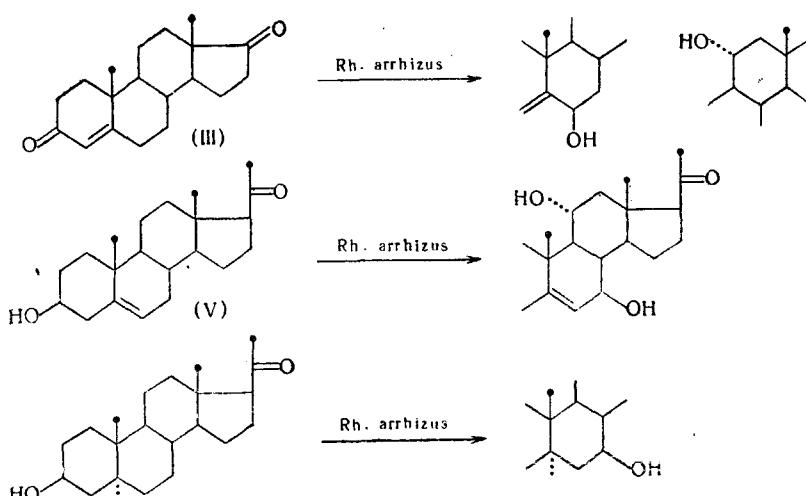
Недавно появилась работа по получению  $\Delta^4$ -прегнентриол-6 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-диона-3,20 при ферментации<sup>15</sup> вещества S Рейхштейна (IV) с *Bacillus cereus* с выходом 30%.

Для всех субстратов, подвергавшихся 6 $\beta$ -гидроксилированию, характерно наличие  $\Delta^4$ -3-кетогруппировки, тогда как характер цепи у C<sub>17</sub> не имеет решающего значения. 6 $\beta$ -оксипроизводные получены и для таких соединений, как прогестерон (II), андростендион (III)<sup>13, 16</sup>.

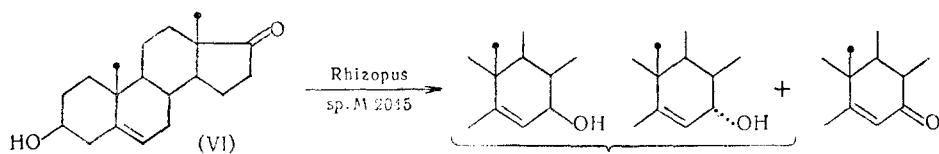
К 7 $\alpha$ -гидроксилированию способны микрорганизмы, относящиеся к *Cephalosporium*<sup>17</sup>, *Helminthosporium*<sup>18</sup>, *Proactinomyces*<sup>19</sup>, *Sincephalostrum*<sup>20</sup>.



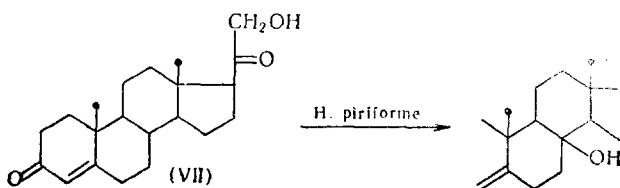
Направление реакции гидроксилирования в некоторых случаях определяется строением колец A и B стероидного скелета. Так, плесень *Rhizopus arrhizus*, осуществляющая 11 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -гидроксилирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов, в частности андростендиона (III)<sup>21</sup>, гидроксилирует pregnenolon (V) в положения 7 $\beta$ - и 11 $\alpha$ -, а соединения ряда аллопрегнана в положение 7 $\beta$ <sup>22, 23</sup>:



Додсон<sup>24</sup> при ферментации  $\Delta^5$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 (VI) со штаммом *Rhizopus* sp. M2045 выделил в числе продуктов реакции молекулярное соединение 7 $\alpha$ - и 7 $\beta$ -гидроксилированных производных:

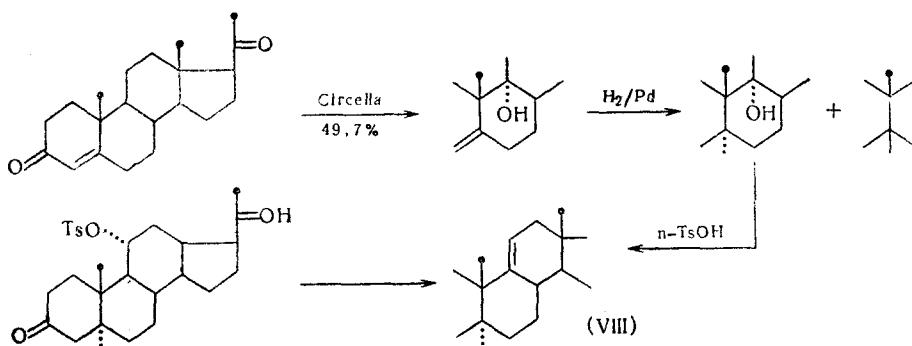


Введение третичного гидроксила у  $C_8$  дезоксикортикоистерона (VIII) осуществлено действием *Helicostylum piriforme*<sup>21</sup>:

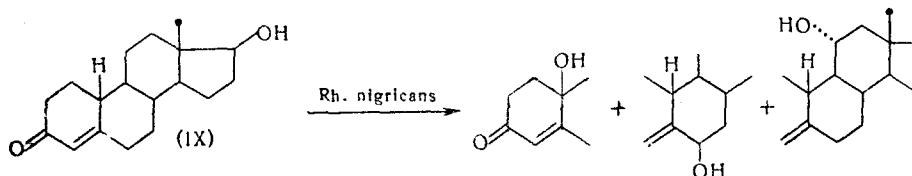


8-гидроксилирование осуществляется такими микроорганизмами, как *Curvularia pallescens*<sup>25</sup>, *Mycog. parasiticus*<sup>26</sup> и др.

А. Шуберт с сотрудниками получили 9 $\alpha$ -оксипрогестерон при помощи культуры *Circella*<sup>27</sup>. Его строение было установлено последовательным гидрированием и дегидратацией в известный  $\Delta^{9(11)}$ -прегнендион-3,20 (VIII):



Гидроксилирование третичного атома углерода в 10 положении имеет место при ферментации 19-нортестостерона (IX) с *Rh. nigricans*, который обычно гидроксилирует в 11 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -положение<sup>28</sup>.

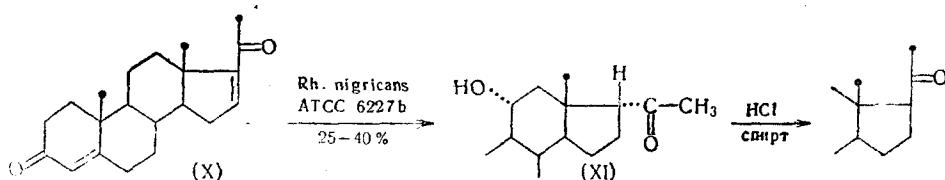


Однако в работе группы Джерасси<sup>29</sup> сообщается об 11 $\alpha$ -моногидроксилировании 19-норпрогестерона штаммом *Rh. nigricans* с выходом 70%.

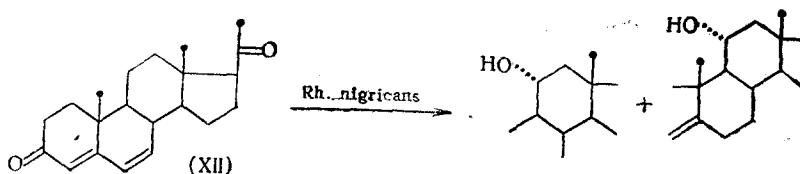
Получение 11 $\alpha$ -оксипрогестерона (I) ферментативным путем Питерсоном<sup>5</sup> в 1952 г. открыло простой путь к введению кислородной функции в 11 положение стероидов, что имеет большое значение для получения кортикостероидов и трудно осуществимо химическим путем.



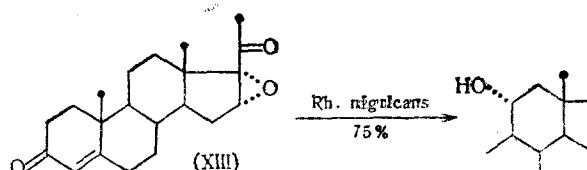
При ферментации прогестерона с культурой *Rh. nigricans* выход  $11\alpha$ -оксиprogестерона составил 95%<sup>30</sup>. Однако не всегда окисление проходит так однозначно, и наряду с  $11\alpha$ -гидроксилированием имеет место  $6\beta$ -гидроксилирование<sup>15, 31</sup>,  $17\alpha$ -гидроксилирование<sup>32, 33</sup> и  $21$ -гидроксилирование<sup>34</sup>. При инкубации  $\Delta^{16}$ -дегидропрогестерона (X) с культурой *Rh. nigricans* был выделен  $11\alpha$ -окси- $17$ -изопрогестерон (XI)<sup>35</sup>.



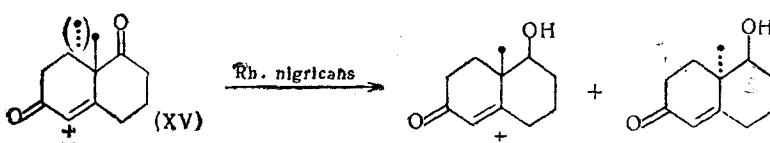
При ферментации  $\Delta^6$ -дегидропрогестерона (XII) со штаммом *Rh. nigricans* частично шло гидрирование  $\Delta^6$ -двойной связи<sup>36</sup>:



При гидроксилировании культурой *Rh. nigricans* выход  $11\alpha$ -оксипроизводного составляет в случае pregnаниона-3,20 40%, а аллопрегнандиона-3,20 только 25%<sup>37</sup>. Группы Эрколи<sup>38</sup> и Питерсона<sup>39</sup> осуществили ферментативное гидроксилирование  $16\alpha$ -,  $17\alpha$ -эпоксипрогестерона (XIII) с выходом до 75%:

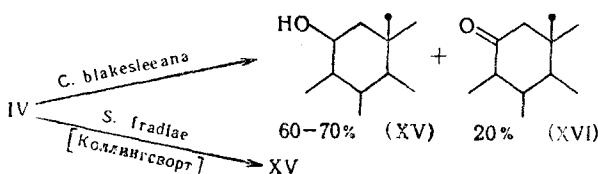


Гидроксилирование стероидов при помощи гриба *Rh. nigricans* является ярким примером сочетания специфичности и разнообразия действия микроорганизмов. При ферментации с *Rh. nigricans* происходит гидроксилирование преимущественно в положение 11 таких стероидных субстратов, как прогестерон (II),  $\Delta^6$ -дегидропрогестерон (XII),  $16\alpha$ ,  $17\alpha$ -эпоксипрогестерон (XIII) и др. Но  $11\alpha$ -гидроксилаза не является единственной ферментной системой, образуемой *Rh. nigricans*. Прелор и Акклин<sup>40</sup> показали, что *Rh. nigricans* способен восстанавливать такие субстраты, как  $\Delta^4$ -9-метилокталинион-3,8 (XIV):



Показано<sup>41</sup>, что при ферментации 4-метилтестостерона метильная группа в положении 4 препятствует входению гидроксильной группы у б углеродного атома и преимущественно образуются 7β- и 11α-гидроксилированные продукты, наряду с образованием незначительных количеств 7α- и 6β-оксипроизводных. Одновременное 11α- и 15β-гидроксилирование описано Мьюром и Додсоном<sup>42</sup>. Мейстер и Вайнтрауб<sup>43</sup> осуществили получение 11α-окситестостерона и тестостерона при помощи *Sporotrichum epigaeum*. 11α-Гидроксилирование осуществлено при ферментации стероидов с культурами *Conidiobolus sp.*, *Basidiobolus* гапаги<sup>44</sup>, *Melarrhizium anisopliae*<sup>45</sup>.

Еще более важно введение в молекулу стероидов 11β-гидроксильной группы, наличие которой обуславливает физиологическую активность кортикоステроидов (гидрокортизон, кортикостерон). Впервые оно было осуществлено Коллингсвортом с сотрудниками, правда, с незначительным выходом<sup>46</sup>:

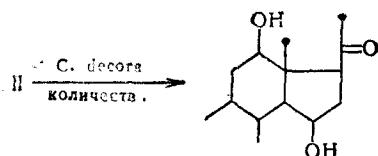


Шалл и Кита<sup>47</sup> получили гидрокортизон (XV) с выходом 41% при ферментации вещества S Рейхштейна (IV) с культурой *Curvularia lunata*, Дюланей<sup>48</sup> с выходом 50%, а Коннел повысил выход гидрокортизона при ферментации вещества S с культурой *Cunninghamella blakesleeana* до 60—70% с одновременным образованием до 20% кортизона (XVI)<sup>49</sup>.

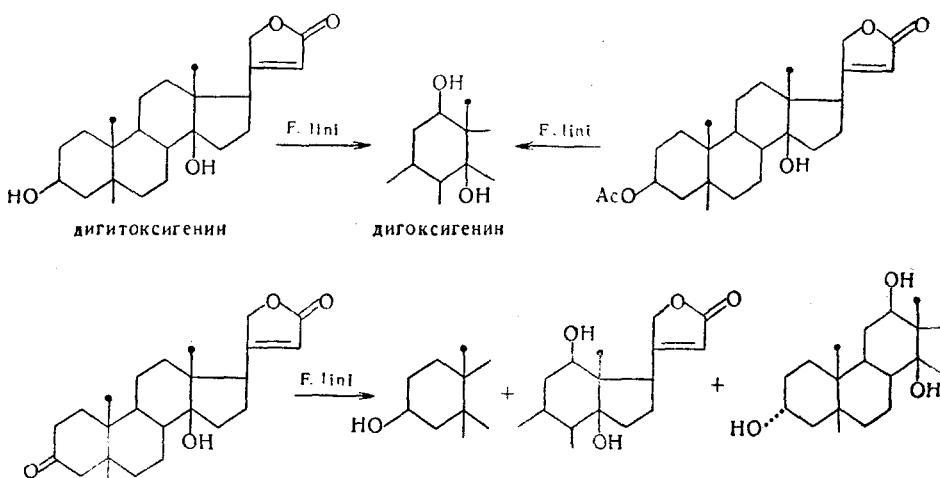
Как было показано, выход гидрокортизона можно повысить при изменении питательной среды, при добавлении в питательную среду триолеатов<sup>50</sup>, фенола<sup>49</sup> и некоторых других веществ.

Опубликовано много сообщений по 11β-гидроксилированию при помощи и других микроорганизмов. Дэвиссон<sup>51</sup> запатентовал получение гидрокортизона (XVI) из вещества S Рейхштейна (IV) с выходом 70% при помощи *Stachilidium theobromae*. Тома с сотрудниками<sup>52</sup> получил преднизолон (XVII) из Δ<sup>1,4</sup>-прегнадиендиол-17α,21-диона-3,20 при помощи *Coniothyrium helleborine*<sup>52</sup>, Сардинас и Шалл<sup>53</sup> провели 11β-гидроксилирование при помощи *Spondiocladium australe* и *S. xylogenum*, а также *Epicosciit*. Одновременно с 11β-гидроксилированием часто протекают гидроксилирование в положении 14α<sup>47</sup> и восстановление 20-кетогруппы<sup>54</sup>. Шмидт-Томэ<sup>55</sup> получил при ферментации вещества S с *Absidia glauca* равные количества гидрокортизона (XV) и эпигидрокортизона (XVIII).

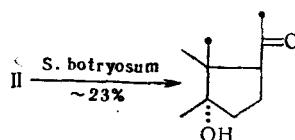
12β-гидроксилирование прогестерона (II) осуществлено А. Шубертом с сотрудниками<sup>56</sup> при помощи *Calonectria decora*:



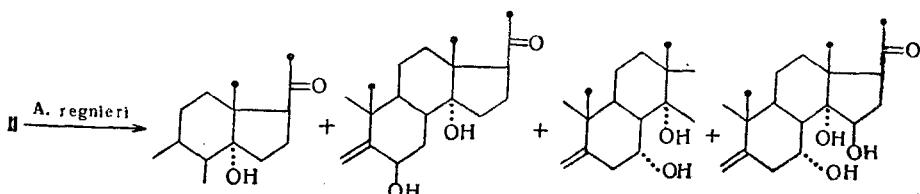
Гиблер и Тамм<sup>57, 58</sup> при изучении превращений сердечных гликозидов и агликонов под действием микроорганизмов установили, что *Fusarium lini* выделяет по меньшей мере четыре системы ферментов, именно, гидроксилазу, осуществляющую гидроксилирование в 12 $\beta$ - и 15 $\alpha$ -положение, эстеразу, омыляющую ацетильные группы, гидрогеназу и  $\beta$ -гликозидазу:



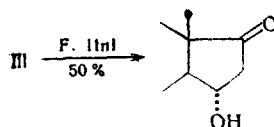
14 $\alpha$ -гидроксилирование осуществляется различными микроорганизмами, например *Stemphilium botryosum*, *Curvularia lunata*, *C. blakesleean* па<sup>59</sup>:



Получение 14 $\alpha$ -оксипрогестерона<sup>60</sup> при помощи *Bacillus cereus* является одним из сравнительно немногих примеров гидроксилирования с помощью бактерий. Ширасака при ферментации<sup>61</sup> прогестерона (II) с культурой *Absidia regnieri* получил смесь продуктов превращения:

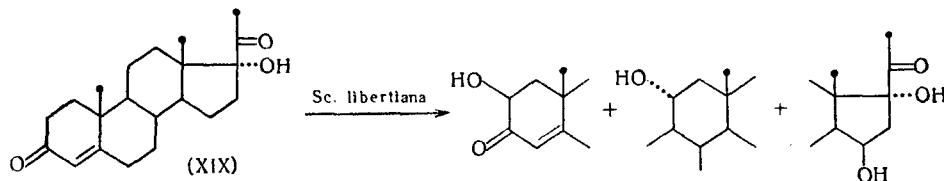


15 $\alpha$ -гидроксилирование осуществляется также многими микроорганизмами, основное место среди которых занимают *Fusarium*<sup>62, 63</sup> и *Penicillium*<sup>64</sup>.



Побочные реакции при 15 $\alpha$ -гидроксилировании упоминаются сравнительно в немногих случаях. Бернстейн с сотрудниками<sup>65</sup>, ферментируя вещество S (IV) со штаммом *Spicaria*, получил соответствующее 15 $\beta$ -оксипроизводное. При инкубации вещества S (IV) с культурой *Bacillus megatherium* был получен  $\Delta^4$ -прегнентриол-15 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-дион-3,20 с выходом 50%<sup>66</sup>. С меньшим выходом получен 15 $\beta$ -оксипрогестерон при ферментации прогестерона. Введение же таким образом 15 $\beta$ -гидроксильной группы в преднизон и преднизолон осуществить не удалось. В этом случае имело место гидрирование  $\Delta^1$ -двойной связи<sup>66</sup>.

15 $\beta$ -гидроксилированные производные были выделены группой японских химиков<sup>67</sup> из сложной смеси продуктов, образующихся при ферментации 17 $\alpha$ -оксипрогестерона (XIX) с культурой *Sclerotinia libertiana*:

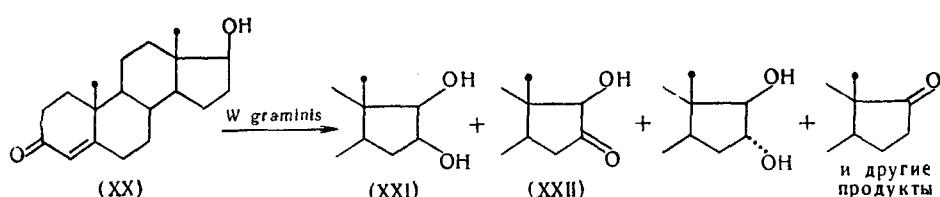


Практически важное 16 $\alpha$ -гидроксилирование осуществляется различными видами актиномицетов. Перлман с сотрудниками<sup>68</sup> получили 16 $\alpha$ -оксипрогестерон с выходом 30—40% при ферментации прогестерона со штаммом *Streptomyces* sp. MD2428. 9 $\alpha$ -Фтор-16 $\alpha$ -оксигидрокортизон был получен с выходом 50% при ферментации 9 $\alpha$ -фторгидрокортизона с культурой *Streptomyces roseochromogenus*<sup>69</sup>.

9 $\alpha$ -Фтор- $\Delta^4$ -андростендиол-11 $\beta$ ,16 $\alpha$ -дион-3,17 получен при помощи *St. roseochromogenus*<sup>70</sup>. Известны случаи 16 $\alpha$ -гидроксилирования с помощью плесеней *Pestalotia funerea*<sup>71</sup> и *Didymella vodakii*<sup>25</sup>.

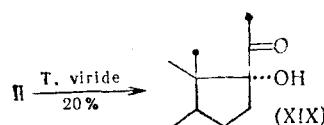
Несмотря на многочисленные поиски культур микроорганизмов, осуществляющих превращения стероидов, до самого последнего времени не было указаний на то, что возможно микробиологическое введение 16 $\beta$ -гидроксильной группы в молекулу стероида. И лишь в 1960 г. появилось сообщение<sup>72</sup> о получении 16 $\beta$ -оксистероидов.

После ферментации тестостерона (XX) с культурой *Wojnowicia graminis* (CBS) тщательным хроматографированием было выделено 10 стероидных продуктов превращения, среди которых были 16 $\beta$ -окситестостерон (XXI) и 16-кетотестостерон (XXII).

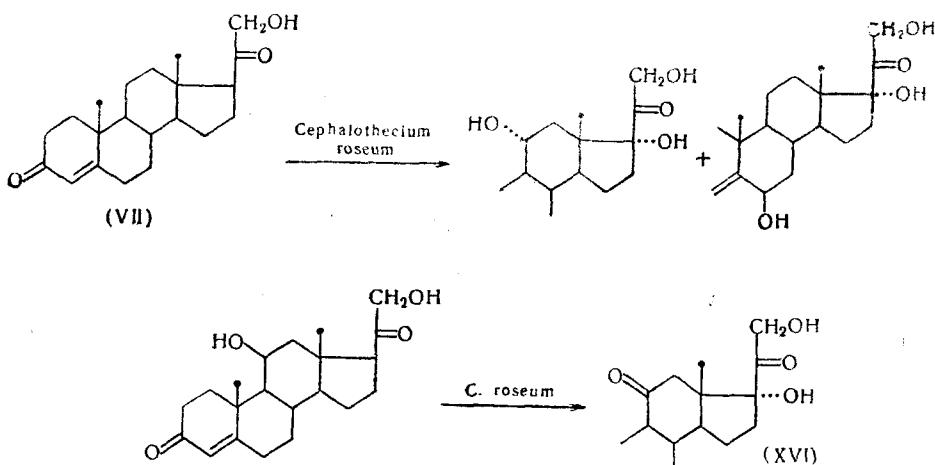


Ранее было известно<sup>73, 74</sup>, что *W. graminis* осуществляет введение гидроксильной группы в 21 положениепрегненовых стероидов.

Представляющее значительный интересmono-17 $\alpha$ -гидроксилирование осуществлено пока только с помощью трех микроорганизмов: *Trichothecium roseum*<sup>75</sup>, *Trichoderma viride*<sup>76</sup> и *Gliocladium*<sup>77</sup>. В остальных слу-

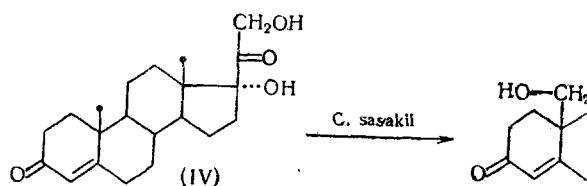


чаях 17 $\alpha$ -гидроксилирование сопровождается такими реакциями, как 11 $\alpha$ ,6 $\beta$ -гидроксилирование<sup>33, 76</sup> и окислением гидроксильной группы в 11 положении<sup>76</sup>.



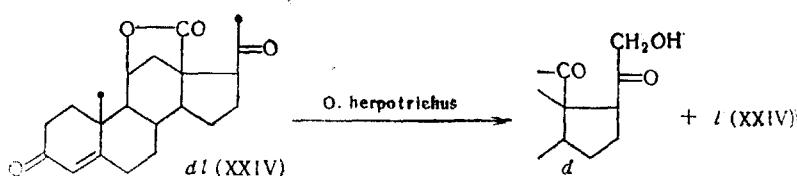
Группа Циба запатентовала получение 18-оксистероидов при действии грибковых культур на 13-метилстериоиды<sup>78</sup>.

По гидроксилированию в 19 положении известны работы японских исследователей<sup>79</sup>, осуществивших получение  $\Delta^4$ -прегнентриол-17 $\alpha$ ,19,21-диона-3,20 (XXIII) ферментацией вещества (IV) с культурой *Cotrina sasakii*.



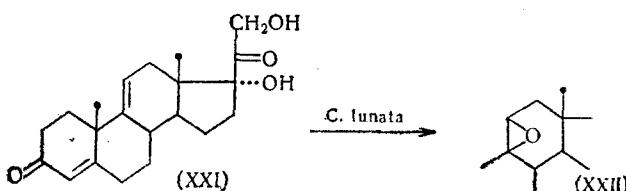
Эта же группа провела 19-гидроксилирование гидрокортизона и 11-эпи-гидрокортизона.

21-гидроксилирование, осуществленное впервые Веттштейна<sup>75</sup>, во многих случаях протекает однозначно. Гидроксилирование в 21 положение удается осуществить с помощью таких микроорганизмов, как *Aspergillus niger*<sup>80</sup>, *Sphaerotilaceae Hendersonia*<sup>77</sup>, *Wojnowicia*<sup>81</sup>. Фишер, Шмидлин и Веттштейн<sup>82</sup> применили микробиологическое гидроксилирование для разделения рацемата (18 $\rightarrow$ 11) — лактона *dl*- $\Delta^4$ -прегненол-11 $\beta$ -диона-3,20 (XXIV). При ферментации рацемата (XXIV) с культурой *Ophiobolus herpotrichus* прошло 21-гидроксилирование только стероида с природной конфигурацией, в то время как *l*-форма осталась неизменной:

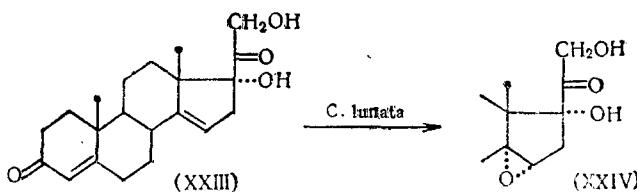


## 2. Эпоксидирование и раскрытие эпоксидного кольца

Близко к реакциям микробиологического гидроксилирования стоит микробиологическое эпоксидирование, разработанное Блумом и Шаллом<sup>83</sup>, которые при инкубации  $\Delta^{4,9}(11)$ -прегнадиендиол-17 $\alpha$ ,21-диона-3,20 (XXI) с культурой *Cyrtularia lunata*, известной как 11 $\beta$ -гидроксилирующая, или *C. blakesleeana* получили 9 $\beta$ ,11 $\beta$ -эпокси- $\Delta^4$ -прегненидиол-17 $\alpha$ ,21-диона-3,20 (XXII):



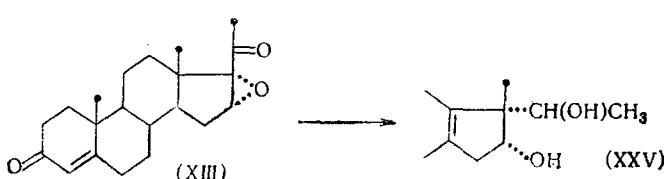
С этим же штаммом было проведено превращение  $\Delta^{4,14}(15)$ -прегна-диендиол-17 $\alpha$ , 21-диона-3,20 (XXIII) с образованием 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -эпокси- $\Delta^4$ -прегненидиол-17 $\alpha$ , 21-диона-3,20 (XXIV):



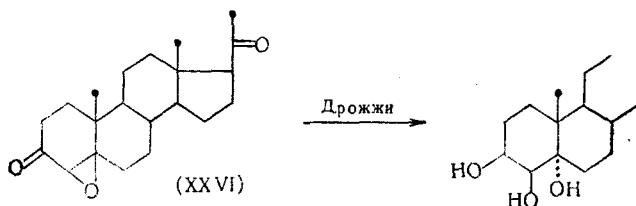
При ферментации этого же субстрата с 11 $\alpha$ -гидроксилирующими микроорганизмами образования эпоксида не наблюдалось, также как и при ферментации с микроорганизмами, неспособными гидроксилировать в положение 14. Перлман с сотрудниками<sup>84</sup> при ферментации  $\Delta^{4,16}$ -прегнадиендиона-3,20, с актиномицетом (обычно 16 $\alpha$ -гидроксилирующим) не обнаружил образования эпоксида. Как мы уже видели выше, при ферментации  $\Delta^5$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 с *Rhizopus*<sup>24</sup> и при ферментации  $\Delta^{16}$ -дегидропрогестерона с *Rh. nigricans*<sup>35</sup> также не происходило образования эпоксидов. Перлман полагает, что микробиологическое эпоксидирование возможно у стероидов, имеющих изолированные двойные связи, при помощи микроорганизмов, способных вводить аксиальные гидроксильные группы в положения, соответствующие месту образования эпоксида.

В самое последнее время чешские исследователи<sup>85</sup> нашли, что при ферментации В-нор- $\Delta^5$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 с культурой *Rh. nigricans* наряду с 11 $\alpha$ - и 16 $\beta$ -гидроксилированными продуктами образуется 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -эпокси-В-норандростанол-3 $\beta$ -он-17 и 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -эпокси-В-норандростанол-3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -он-17.

Раскрытие эпоксидного кольца также может быть осуществлено микробиологическим путем. Камерино и Моделли<sup>86, 87</sup> раскрыли при помощи дрожжей эпоксидное кольцо 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -эпоксипрогестерона (XIII). При этом прошла перегруппировка с образованием 17 $\beta$ -метил-18-нор- $\Delta^{4,13}$ -прегнадиендиол-16 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -она-3 (XXV):



В 1959 г. Камерино<sup>88</sup> раскрыл эпоксидное кольцо 4,5-эпоксипрогестерона (XXVI) с выходом 65%. При этом прошло восстановление 3-кетогруппы:

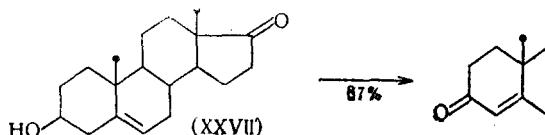


### 3. Введение кетогруппы

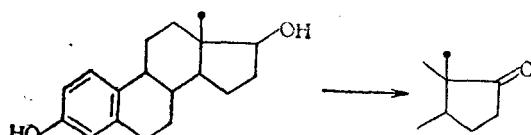
В некоторых случаях при ферментативных превращениях стероидов имеет место прямое введение кетогруппы. Так, при гидроксилировании вещества S Рейхштейна при помощи *C. blakesleeana*<sup>49</sup> получается до 20% кортизона. В то же время, если взять в качестве субстрата гидрокортизон, то кортизон не образуется<sup>89</sup>. Кетопроизводное было выделено также, как сказано выше<sup>24</sup>, при ферментации  $\Delta^4$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 со штаммом *Rhizopus*. Все это свидетельствует, о том, что в некоторых случаях образование кетогруппы идет не через окисление гидроксильной группы, а непосредственно окислением метиленовой группы. Но прямое введение не единственный путь микробиологического образования кетогруппы. Ерошин<sup>90</sup> показал, что при ферментации гидрокортизона (XV) с культурой *Cunninghamella elegans* образуется кортизон (XVI), а при ферментации вещества S Рейхштейна (IV) была получена смесь гидрокортизона, эпигидрокортизона и кортизона. В то же время, при ферментации с культурой *C. elegans* преднизолона (XVII) и эпигидрокортизона Ерошин не получил каких-либо продуктов превращения.

### 4. Окисление гидроксильной группы

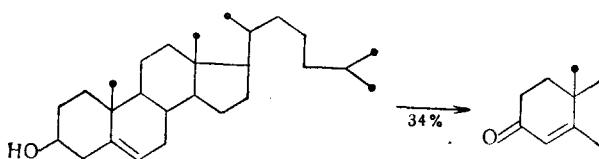
В 1937 г. Мамоли и Верчеллоне<sup>1</sup> в Милане опубликовали работу по окислению 3 $\beta$ -гидроксильной группы дегидроэпиандростерона (XXVII) при помощи дрожжей. Однако, когда Мамоли пытался повторить эту работу в Берлине, используя имевшийся там тот же штамм дрожжей, то окисления не наблюдалось. Им было установлено, что дегидрирование оксигруппы осуществлялось аэробными бактериями, которыми был заражен миланский штамм дрожжей<sup>3</sup>.



Ганч с сотрудниками<sup>91</sup> провел селективное дегидрирование 17 $\beta$ -эпимера эстрадиола при помощи актиномицетов:



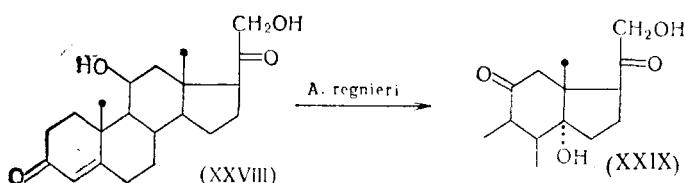
В работах Тарфитта<sup>92, 93</sup> было исследовано микробиологическое дегидрирование различных стеринов, в частности, осуществлено окисление холестерина (XXXV) с выходом 34%,



и тестостерона в андростендион с выходом 47% при помощи *Proactinomyces erythropolyis*.

Микробиологическое окисление  $3\beta$ -оксигруппы связано со смещением двойной связи из кольца *B* в кольцо *A*.

При ферментации кортикостерона (XXVIII) с *Absidia regnieri*<sup>94</sup> был выделен  $\Delta^4$ -прегнендиол-14 $\alpha$ ,21-трион-3,11,20 (XXIX):

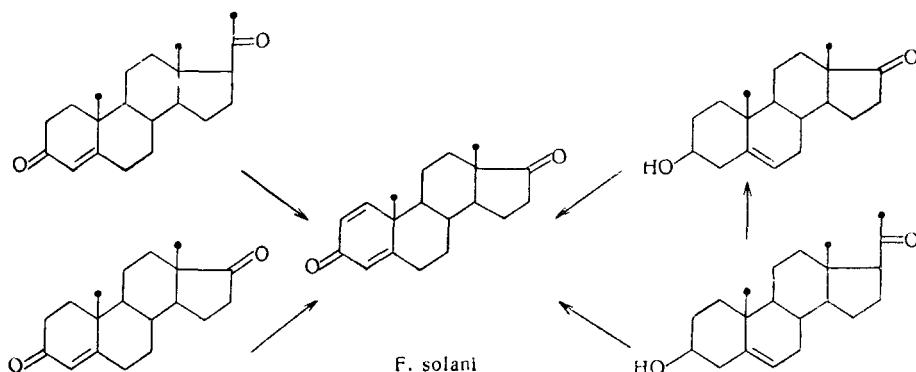


При ферментации же эпикортикостерона и гидрокортизона не было обнаружено продуктов превращения.

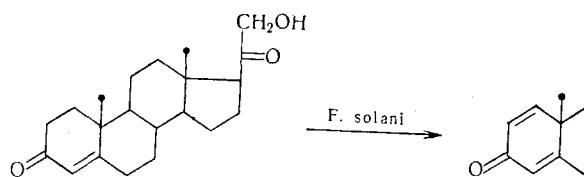
Описано<sup>95</sup> и окисление оксигрупп в положении 7 и 12.

### 5. Дегидрирование стероидного скелета

После открытия Фишером и Веттштейном<sup>96</sup> микробиологического дегидрирования при помощи грибов из рода *Fusarium* на страницах журналов и в патентной литературе стали появляться одна за другой работы по микробиологическому дегидрированию стероидов в положении 1,2. При ферментации pregnановых стероидов происходило одновременное окислительное отщепление боковой цепи:



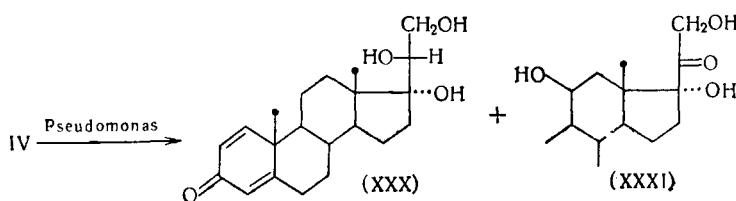
Фишер, Мейстр и Веттштейн<sup>97</sup> осуществили дегидрирование  $\Delta^4$ -прегненов при помощи *F. solani* и *Calonestria decora* без отщепления боковой цепи:



По японскому патенту<sup>98</sup>, при ферментации прогестерона (II) с *F. solani* получается 30—50%  $\Delta^1$ -дегидропрогестерона и 30—40%  $\Delta^{1,4}$ -андростадиендано-3,17. Деградация боковой цепи при ферментации с *F. solani* не имеет места, если применяются субстраты с диоксиацитоновой цепью в положении 17<sup>99</sup>.

В лаборатории Скрябина при ферментации кортизона (XVI) и гидрокортизона (XV) со штаммом *Mycobacterium* были получены<sup>100, 101</sup> соответственно преднизон и преднизолон с выходами 75—80%.

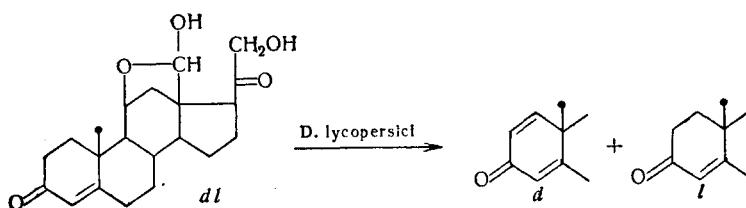
Интерес представляет получение преднизолона из вещества S Рейхштейна (IV) группой японских исследователей. Сначала они описали ферментацию вещества S (IV) с видом бактерий *Pseudomonas*, с получением смеси  $\Delta^{1,4}$ -прегнадиентриол-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-она-3 (XXX) и  $\Delta^4$ -прегнентриол-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-диона-3,20 (XXXI) (последний образуется лишь в незначительном количестве)<sup>54</sup>.



В ходе работ ими был получен облучением ультрафиолетовым светом мутант *Pseudomonas*, продуцирующий преднизолон (XVII) из вещества S Рейхштейна с выходом 30%<sup>102</sup>. Этот пример показывает, что образование ферментных систем микроорганизмами обладает известной гибкостью и, по-видимому, метод получения мутантных штаммов имеет большое будущее и достоин систематического изучения.

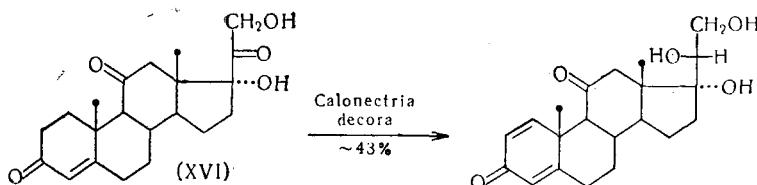
Как мы уже видели, в очень многих случаях микроорганизмы обращают, к сожалению, не одну, а несколько ферментных систем, что дает несколько различных продуктов реакции или затрагивает одновременно различные места молекулы стероида. Однако в приведенном примере сочетание  $\Delta^1$ -дегидрогеназы и 11 $\beta$ -гидроксилазы оказалось весьма удачным и позволило получить преднизолон из вещества S в одну стадию.

В упомянутой выше работе<sup>82</sup> при ферментации рацемата альдостерона с *Didymella lycopersici* происходило дегидрирование только стероида с природной конфигурацией:

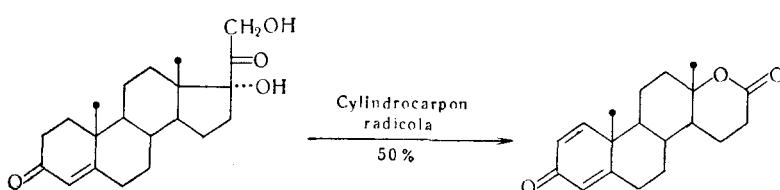


В лаборатории Чарни<sup>103</sup> осуществлено получение преднизона из кортизона при ферментации последнего с *Corynebacterium simplex* с выходом 95%.

Дегидрированию в положении 1,2 часто побочно сопутствует восстановление 20-кетогруппы в 20 $\beta$ -оксигруппу<sup>104</sup>:

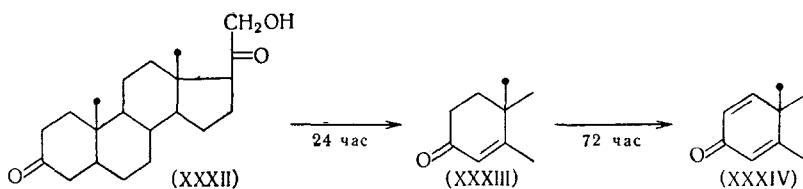


Интересно часто встречающееся при дегидрировании окислительное расщепление кольца D с образованием лактонного кольца<sup>105</sup>:



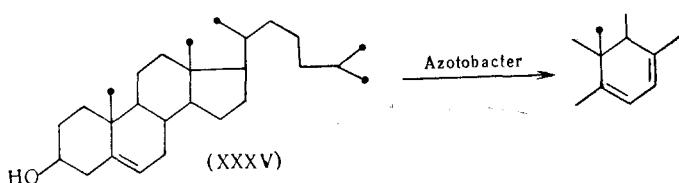
При ферментации  $\Delta^4$ -андростендиол-2 $\alpha$ ,17 $\beta$ -она-3<sup>106</sup> с культурой *Bacillus sphaericus* (ATCC 7055) получают  $\Delta^{1,4}$ -андростадиенол-2 $\alpha$ -дион-3,17. Для устранения сомнений в том, не является ли последнее соединение артефактом, тот же субстрат ферментировали с денатурированной культурой *B. sphaericus*, после чего почти полностью было возвращено исходное вещество.

Известны примеры дегидрирования стероидов при помощи микроорганизмов и в других положениях молекулы. Шалл<sup>107</sup>, ферментируя pregnanol-21-дион-3,20 (XXXII) с культурой *Protaminobacter alboflavum* получил  $\Delta^4$ -прегненол-21-дион-3,20 (XXXIII), а при более длительном ферментировании —  $\Delta^{1,4}$ -прегнадиенол-21-дион-3,20 (XXXIV):



Фишер и Веттштейн<sup>96</sup> при ферментации  $\Delta^5$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 с *F. solani* получили  $\Delta^{1,4}$ -андростадиендион-3,17.

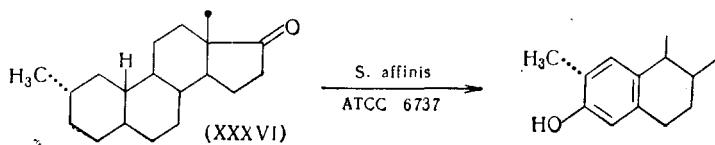
Введение Крамли и Хорватом<sup>108</sup> двойной связи в 7 положение холестерина (XXXV) при ферментации со штаммом *Azotobacter* было первым примером микробиологического введения двойной связи в молекулу стероида:



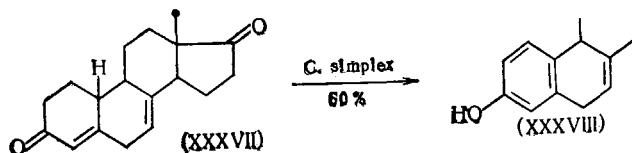
Питерсон с сотрудниками<sup>109</sup> показали, что при ферментации с культурой *Septomyxa affinis* (ATCC 6737) pregnантриона-3,11,20 и аллопрегнантриона-3,11,20 выход дегидрированных в положении 1,2 производных составляет соответственно 5—10 и 40—45%. Это уже второй пример, где мы четко видим различие поведения цис- и транс-сочлененных кольцевых систем в микробиологических реакциях. В этой же работе при ферментации 19-нор- $\Delta^4$ -андростенол-17 $\beta$ -она-3 с *S. affinis* получены эстрон (выход 55%) и эстрадиол (выход 12%) — при отсутствии ангулярной метильной группы в положении 10 произошла ароматизация кольца *A*.

Кушинский<sup>110</sup> при ферментации  $\Delta^4$ -3-кето-19-норстероидов с *Cogycnebacterium simplex* получил ароматизированное кольцо *A*. При этом среди продуктов реакции было обнаружено небольшое количество вещества с гидроксильной группой в положении 1 или 2. Это дает возможность предположить, что дегидрирование проходит через стадию гидроксилирования и последующую дегидратацию.

В работе Питерсона с сотрудниками<sup>111</sup> при ароматизации 2 $\alpha$ -метил-19-норандростанона-17 (XXXVI) с помощью *Septomyxa affinis* также происходило гидроксилирование стероида:

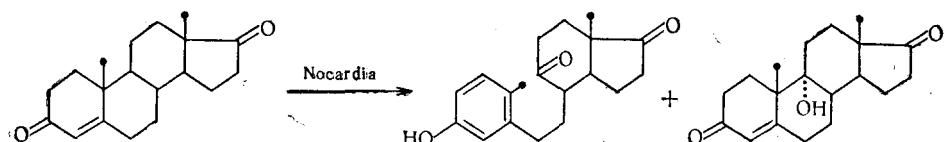


Джерасси с сотрудниками<sup>112</sup>, ферментируя 19-нор- $\Delta^4,7$ -андростадиенон-3,17 (XXXVII) с *C. simplex*, получили с выходом 60% эквилинов (XXXVIII):



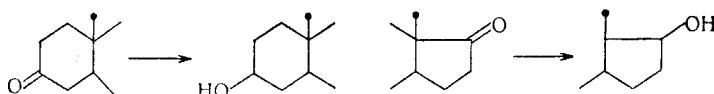
Герцог и Нобиле<sup>113</sup> получили ферментацией 19-норгидрокортизона с культурой *Cogycnebacterium simplex* (ATCC 6946) соответствующее ароматизированное в кольце *A* соединение.

Условием для микробиологической ароматизации кольца *A* стероидов, по-видимому, является отсутствие метильной ангулярной группы в положении 10. Однако ароматизация сопутствует разрыву связи между 9 и 10 углеродными атомами андростендиона (III) при ферментации его с *Nocardia*, по-видимому, проходящему через стадию 9 $\alpha$ -гидроксилирования<sup>114</sup>:



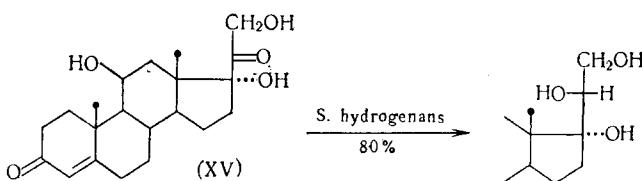
## 6. Реакции восстановления

Широко распространено и микробиологическое восстановление стероидов, в некоторых случаях представляющее большой практический интерес. Мамоли и Верчеллоне еще в 30-х годах<sup>1, 2, 115, 116</sup> осуществили при помощи дрожжей превращения  $C_{19}$  стероидов по схемам:



Себек и Михаэльс<sup>117</sup> при изучении микробиологической трансформации андростендиона (III) под действием *Trichomonas gallinae* [Protozoa] установили, что при аэробных условиях ферментации происходит окисление гидроксила, а при анаэробных — восстановление кетогруппы у  $C_{17}$ . При ферментации ацетата  $\Delta^5$ -андростенол-3 $\beta$ -она-17 с *Penicillium notatum* получен с выходом 79% тестостерон<sup>118</sup>.

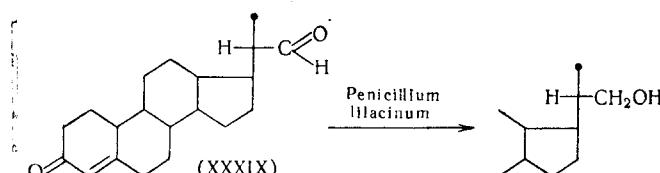
Многие микроорганизмы способны стереоспецифично восстанавливать 20-кетогруппу различных стероидных субстратов. Шмидт-Томэ<sup>55</sup> избирательно восстановил 20-кетогруппу гидрокортизона (XV) с выходом 80% при помощи штамма *Streptomyces*, выделенного им из почвы и названного *S. hydrogenans*:



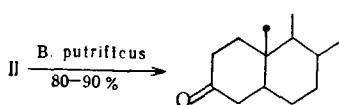
В более поздней работе<sup>119</sup> Шмидт-Томэ установил специфичность действия *S. hydrogenans* на диоксиацитоновую цепочку — при ферментации прогестерона (II) и дезоксикортикостерона (VII) не было обнаружено продуктов превращения. Эта специфичность действия *S. hydrogenans* на диоксиацитоновую цепь в положении 17 не наблюдается у других видов микроорганизмов. Питерсон<sup>21</sup> восстановил 20-кетогруппу дезоксикортикостерона ферментацией его со штаммом *Streptomyces*.

Восстановление 20-кетогруппы в 20 $\beta$ -оксигруппу характерно для многих видов актиномицетов<sup>120</sup>. К восстановлению 20-кетогруппы способны и многие другие микроорганизмы, например, *Curvularia lunata*<sup>121</sup>, *Corynebacterium simplex*<sup>122</sup>, *Pseudomonas*<sup>123</sup>, *Mycobacterium*<sup>124, 125</sup>.

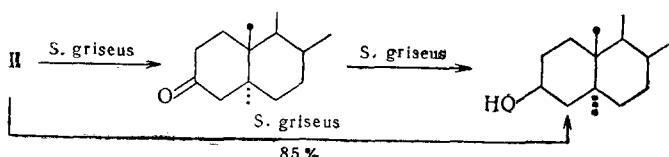
Питерсон<sup>126</sup> восстановил альдегидную группу в положении 22 в бис-нор- $\Delta^4$ -холендионе-3,22 (XXXIX):



Микроорганизмы способны осуществить и гидрирование двойных связей. При помощи *Bacillus putrifacetus*<sup>127</sup> с высоким выходом осуществлено гидрирование  $\Delta^4$ -двойной связи в различных стероидах:

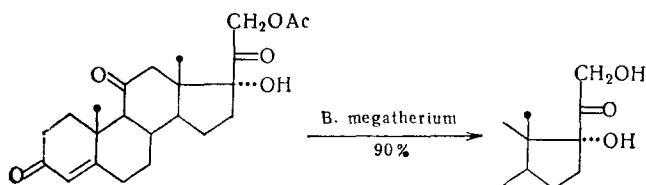


Вейсц с сотрудниками<sup>34</sup> отметил, что при инкубации дезоксикортикоэстераона с культурой *Ophiobolus heterotrichus* возможно гидрирование двойной связи. Недавно появилось сообщение Фишера и Веттштейна<sup>128</sup>, авторы при помощи *Streptomyces griseus* провели ступенчатое восстановление  $\Delta^4$ -3-кетостероида сначала в насыщенный кетон и затем в спирт.



## 7. Реакции гидролиза

В качестве примеров микробиологического омыления ацетильных групп, обычно легко протекающего, можно привести омыление при помощи *Flavobacterium dehydrogenans*<sup>129</sup> и омыление при помощи выделенной в лаборатории Суворова культуры *Bacillus megatherium*, специфичной для дезацетилирования 21-ацетатов<sup>130</sup>:

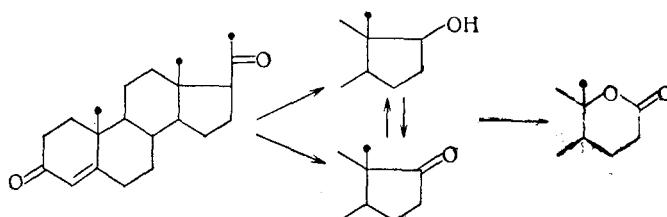


Во многих случаях дезацетилирование сопутствует основной, характерной для данного организма реакции. Цече<sup>131</sup> показал, что при ферментации 21-ацетата вещества S Рейхштейна с культурой *Cirrularia lunata* скорость дезацетилирования ацетата вещества S Рейхштейна выше скорости гидроксилирования вещества S и что гидроксилированию подвергается только омыленный диол. Это согласуется с данными, полученными Ерошиным и Красильниковым<sup>90</sup> при ферментации 21-ацетата гидрокортизона с культурой *Cunninghamella elegans*.

Некоторые микроорганизмы выделяют ферменты, способные гидролизовать стероидные сапонины до сапогенина и сахара<sup>132</sup>.

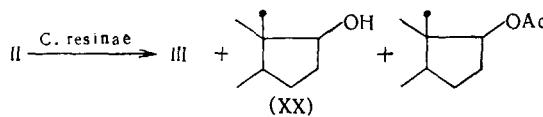
## 8. Реакции, связанные с разрывом углерод-углеродных связей

Как уже упоминалось выше<sup>105</sup>, некоторым микробиологическим реакциям, особенно дегидрированию, сопутствует расщепление кольца D стероида с образованием лактонного кольца. Микробиологическое образование тестололактонов может происходить и как самостоятельная реакция. Чапек с сотрудниками<sup>133</sup> осуществил при помощи таких микроорганизмов как *Aspergillus orizae*, *A. chevalieri*, *Penicillium citri* и др. превращения прогестерона по схеме:



Довольно часто встречается реакция микробиологической деградации боковой цепи прогнановых стероидов с образованием 17-кето- или  $17\beta$ -оксигруппы. Шалл и Роутен<sup>134</sup> при ферментации прогестерона (II) с культурой *Cylindrocephalum augeum* QM 610 получили смесь андростендиона (III) и тестостерона (XX). Они же<sup>135</sup> при ферментации прогестерона с *Neocosmospora vasinfecta* получили тестостерон с выходом 69 %. Деградация боковой цепи осуществлена и с некоторыми другими микроорганизмами<sup>136</sup>.

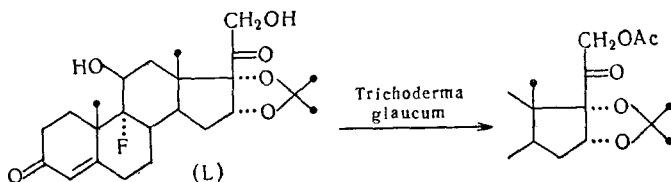
В самое последнее время появились работы по микробиологическому образованию  $17\beta$ -ацетатов стероидов. При ферментации прогестерона с культурой *Cladosporium resinae*<sup>137</sup> были выделены андростендион, тестостерон и ацетат тестостерона:



Если же вместо прогестерона в тех же условиях ферментировать тестостерон, то ацетат тестостерона не образуется. При применении прогестерона, меченного  $21\text{-C}^{14}$  показано, что образование ацетата тестостерона является промежуточной стадией деградации боковой цепи.

Очевидно, такой путь микробиологического образования ацетатов не единственно возможный. При ферментации андростендиона (III) с культурой *Saccharomyces fragilis* (ATCC 100222)<sup>138</sup> выделена смесь тестостерона и ацетата тестостерона. В этом случае трудно предположить, что именно является источником углерода для образования ацетоксигруппы.

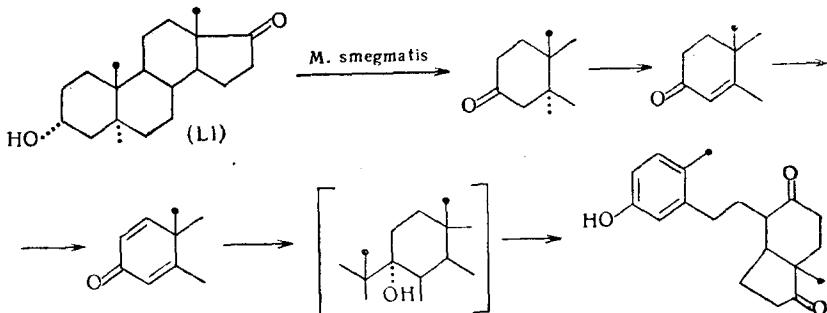
21-ацетаты выделены с высоким выходом и при ферментации  $16\alpha$ ,  $17\alpha$ -изопропилидендиоксистероидов с культурой *Trichoderma glaucum* [Lederle № Z-636]<sup>139</sup>. При ферментации  $16\alpha, 17\alpha$ -изопропилидендиокси- $9\alpha$ -фтор- $\Delta^4$ -прегнениол- $11\beta$ , 21-диона-3,20 (L) выход соответствующего 21-ацетата составляет 70 %:



При ферментации с этой же культурой стероидов, не содержащих  $16\alpha$ ,  $17\alpha$ -изопропилидендиоксигруппы авторы не обнаружили продуктов ацетилирования.

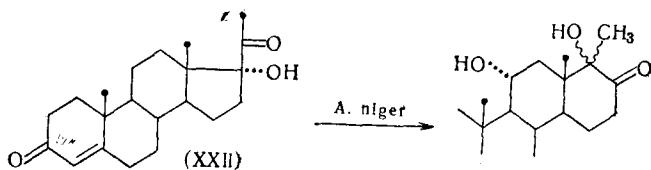
Из работ, описывающих микробиологические превращения стероидов, связанные с расщеплением углерод-углеродной связи стероид-

ного скелета, следует упомянуть работу К. Шуберта с сотрудниками<sup>140</sup>, предложивших на основании полученных ими кинетических данных схему превращения аллопрегнанол-3 $\beta$ -она-17 (LI) при ферментации его с *Mycobacterium smegmatis*:

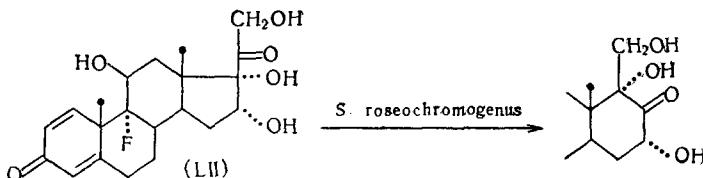


Такой механизм расщепления кольца *B* стероидного скелета подтверждается и работами Додсона и Мыюра<sup>114, 141, 142</sup>.

Любопытно выделение<sup>31</sup> *D*-гомостероида при ферментации 17 $\alpha$ -оксипрогестерона (XXII) с культурой *Aspergillus niger*:



Не менее любопытно было и получение *D*-гомостероида при ферментации<sup>143</sup> триамцинолона (LII) с культурой *Streptomyces roseochromogenus*:



Однако в настоящее время Гудман и Смит<sup>144, 145</sup> выяснили, что в данном случае *D*-гомоизомеризация обусловлена избытком ионов железа в ферментационной среде, а отнюдь не биологическими процессами.

### III. О НЕКОТОРЫХ АСПЕКТАХ МЕХАНИЗМА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ СТЕРОИДОВ

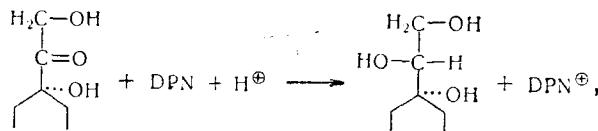
В настоящее время нет сомнений в том, что микробиологические превращения стероидов проходят под действием ферментных систем, образуемых микроорганизмами. Эти системы включают несколько ферментов, каждый из которых ответственен за отдельную стадию превращения. В некоторых случаях эти ферменты выделены в довольно чистом состоянии. Большую работу в этом направлении проводит группа Талала, систематически исследующая ферменты, выделенные ими из почвы бактерии *Pseudomonas testosteroni*, осуществляющей окисление тестостерона (XXVI) в андростендион (III)<sup>146</sup>. Ими были выделены 3 $\beta$ -, 17 $\beta$ -дегидрогеназы<sup>147</sup>,  $\Delta^1$ - и  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -дегидрогеназы<sup>148</sup> высокой степени.

чистоты. В 1960 г. появилось сообщение<sup>149</sup> о выделении  $\Delta^5$ -3-кето- $\Delta^4$ -3-кетоизомеразы в кристаллическом состоянии.

На первый взгляд кажется непонятным, почему микроорганизмы перерабатывают предлагаемые им стероиды. Микроорганизмы в подавляющем большинстве случаев не нуждаются в стероидах как источнике питания и их организм прекрасно осуществляет свои функции в отсутствие стероидов. Правда, некоторые микроорганизмы содержат и вырабатывают стерины<sup>150</sup>, но их образование не связано с ферментами, участвующими в превращениях стероидов. Фишер и Веттштейн<sup>151</sup> показали, что эргостерин, выделенный из 11 $\alpha$ -гидроксилирующих грибов вида *Rhizopus*, не содержит 11 $\alpha$ -гидроксилированных примесей. Работы последних лет в некоторой степени пролили свет на этот вопрос. Чапек<sup>152, 153</sup> установил, что внесение стероидов, например, прогестерона, в растущую на питательной среде культуру *Rh. nigricans* приостанавливает рост и дыхание микроорганизма до момента завершения трансформации прогестерона в 11 $\alpha$ -оксипрогестерон, в то время как внесение 11 $\alpha$ -оксипрогестерона не оказывает такого влияния. Лестер<sup>154</sup> показал, что рост *Neocosmospora crassa* ингибируется добавлением в питательную среду дезоксикортикоэстера. Максвелл с сотрудниками<sup>155</sup> нашел, что добавление стероидов (андростендион, дезоксикортикоэстерон, прогестерон и андростандин) в концентрациях 0,13 мг/мл ингибирует рост *Saccharomyces fragilis*, причем при ферментации андростендиона происходит образование ацетата тестостерона. На основании этих данных можно предположить, что определенные стероиды являются ядами для данного вида микроорганизмов и последние приспособливаясь выделяют ферменты, катализирующие превращение стероида в нетоксичную для микроорганизма форму. Есть также и указания, что микроорганизм поглощает стероид и выделяет в культуральную среду продукты его превращения<sup>146, 151</sup>.

В работах Талалая<sup>147</sup>, Питерсона<sup>156</sup> и некоторых других исследователей показан адаптивный характер образования стероидпревращающих ферментов.

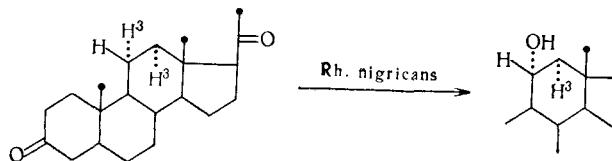
Много интересного для выяснения ферментативного механизма биопревращений стероидов можно ожидать от исследования «тонкой» структуры ферментных реакций, выяснения кофакторов и т. п. К сожалению, рассмотрение этих работ, например<sup>157, 158</sup>, выходит за рамки данной статьи. Для более подробного знакомства с этой областью отсылаем читателя к интересному обзору Фишера и Веттштейна<sup>99</sup> и остановимся лишь на нескольких работах последних лет. Гюбенер и Лемманн<sup>159</sup> установили, что восстановление 20-кетостероидов под действием фермента, выделенного из *Streptomyces hydrogenans* требует присутствия фосфорицидиннуклеотида и протекает по схеме:



причем окисляется стехиометрическое количество дифосфорицидиннуклеотида.

Интересным представляется тот факт, что 2,4-динитрофенол, ингибирующий самые различные процессы в живом организме (процессы, связанные с переносом энергии), не оказывает влияния даже в высоких концентрациях на гидроксилирование прогестерона при помощи *Cyathula lunata*<sup>160</sup>.

Питерсон с сотрудниками на примере  $7\alpha$ ,  $11\alpha$ - и  $11\beta$ -гидроксилирования<sup>161, 162</sup> меченых стероидов показал, что при этом не происходит вальденовского обращения и гидроксильная группа вступает на место водородного атома с сохранением конфигурации:

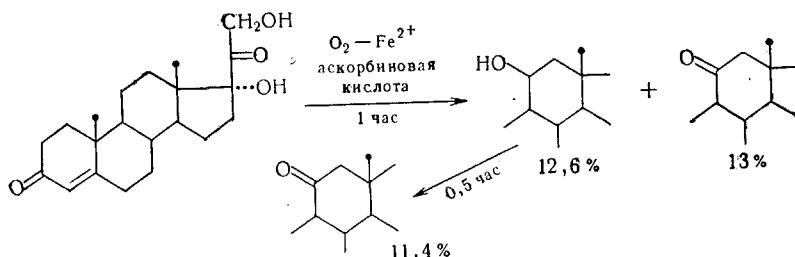


Шмидт-Томэ с сотрудниками<sup>163</sup> нашел, что при дегидрировании кортикостероидов при помощи *Bacillus subtilis* добавление в культуральную среду небольшого количества культуры *Rh. nigricans* повышает выход  $\Delta^1$ -дегидропроизводного, хотя сам *Rh. nigricans* неспособен к дегидрированию. Найдено также, что добавление незначительных количеств некоторых стероидов облегчает дегидрирование. Мэрей<sup>164</sup> добавлял 0,1 мг прогестерона на 20 мг кортизона при дегидрировании последнего при помощи *Septomyxa affinis*, чем облегчал эту реакцию. Возможно, эти добавки играют роль кофакторов, облегчающих переход водорода в системе субстрат — фермент.

Цече<sup>165</sup> подробно исследовал гидроксилирование стероидов при помощи 15 штаммов *Curvularia*, показав на опытах с отфильтрованным мицелием, что в нативной жидкости *Curvularia* не содержится стероидных гидроксилаз. Исследовав влияние таких добавок, как NaCN, NaN<sub>3</sub>, 2,4-динитрофенол, NaF, Цече пришел к выводу, что при гидроксилировании при помощи *Curvularia* решающее значение имеют ферменты с тяжелыми металлами, катализирующие переход молекулярного кислорода на молекулу стероида, причем гидроксилирование обусловлено ионами Fe<sup>2+</sup> и почти не зависит от наличия ионов Cu<sup>2+</sup>.

На основании различия во влиянии на гидроксилирование таких витаминов, как амид никотиновой кислоты, пантенол, витамины B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, Цече считает, что в гидроксилировании участвуют флавиновые ферменты. Как полагает Цече, сильно липофильные стероиды блокируют активные клеточные центры микроорганизма, а при гидроксилировании снижается липофильность стероида и, следовательно, гидроксилирование является защитной функцией микроорганизма. Гидроксилазы *Curvularia* не имеют адаптивного к стероидам характера и Цече объясняет их наличие тем, что в природных условиях микроорганизм должен защищаться от аналогичных, но не стероидных, липофильных веществ.

Хочется вкратце упомянуть такое интересное направление, как окисление в системах, моделирующих сложные ферментные системы микроорганизмов. При действии на вещество S Рейхштейна системы, состоящей из аскорбиновой кислоты, сульфата железа и молекулярного кислорода в фосфатном буфере (pH 7,2; 37°) происходит, подобно био-



логическому, стереоспецифичное гидроксилирование с последующим окислением гидроксила в кетогруппу<sup>166</sup>.

В заключение этого раздела надо подчеркнуть, что хотя микроорганизмы и способны производить различные превращения разнообразных субстратов, в некоторых случаях они проявляют высокую специфичность. Ферментация вещества S Рейхштейна с культурой *Bacillus megatherium* приводит к образованию 15 $\beta$ -оксипроизводного с выходом 50%, однако получить таким путем 15 $\beta$ -оксипроизводные преднизона и преднизолона не удалось<sup>66</sup>. Культура *Absidia regnieri* окисляет 11 $\beta$ -оксигруппу и вводит 14 $\alpha$ -оксигруппу в кортикостерон, но не действует на эпикортикостерон и гидрокортизон<sup>95</sup>. Культура *Syncephalothrix racemosum*, гидроксилирующая прогестерон в положении 7 $\alpha$ , 14 $\alpha$ - и 15 $\beta$ , не гидроксилирует гидрокортизон и 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ -диоксипрогестерон даже при длительном ферментировании<sup>20</sup>. Этот перечень можно было бы значительно продолжить.

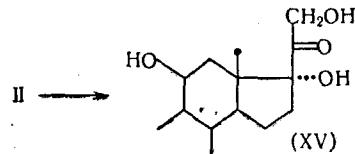
#### IV. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Рассмотрев коротко многообразие микробиологических превращений стероидов, можно видеть, что многие реакции перспективны для промышленности стероидных гормонов. Многие из них уже заняли свое место как промежуточные стадии в производстве гормонов. В Советском Союзе было осуществлено в полузаводском масштабе получение 11 $\alpha$ -оксипрогестерона ферментацией прогестерона с культурой *Rh. nigricans*<sup>167</sup>. Большое значение для промышленности имеет микробиологическое 11 $\beta$ -гидроксилирование, ибо введение кислородной функции в 11 положение химическим путем чрезвычайно сложно. Известно также, что гидроксилирование в положении 16 $\alpha$ , 21 и дегидрирование стероидов в положении 1,2 дает возможность получения высокоактивных гормональных препаратов. Однако «химическое» дегидрирование при помощи  $SeO_2$  приводит к получению гормонов, загрязненных селеном, что исключает их применение в клинике. Микробиологическое дегидрирование конкурирует с химическим не только в этом отношении, но и в отношении выходов.

Применение микробиологических реакций в промышленности отчасти ограничивается необходимостью применения больших количеств растворителей при выделении стероидов из ферментационной массы, но это преодолимо разработкой технологически приемлемой схемы их регенерации.

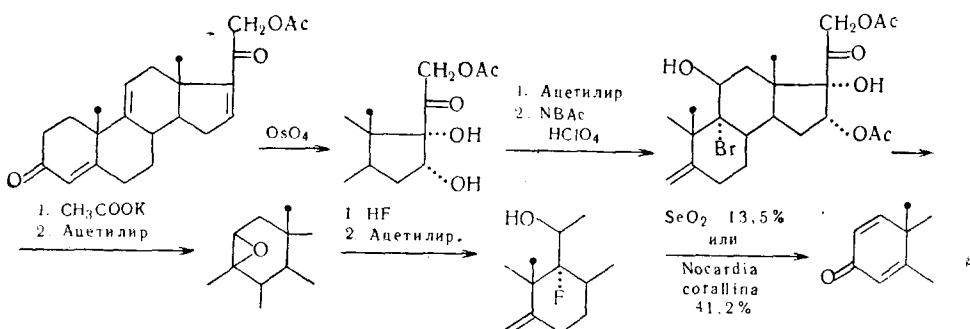
Большой интерес для промышленности представляют реакции, осуществляемые смешанными культурами микроорганизмов, что позволяет в одну стадию вводить гидроксильные группы в различные места молекулы.

Мак-Алир<sup>168</sup>, ферментируя прогестерон одновременно с тремя видами микроорганизмов *Wojnowicia graminis*, *Trichoderma viridae* и *Cirrularia luna* получил гидрокортизон:

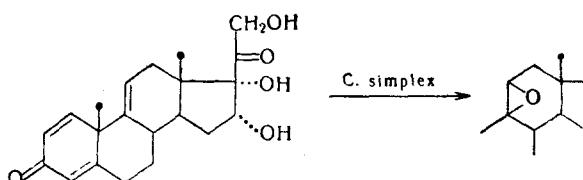


Значение микробиологических реакций не ограничивается их промышленным применением. В последние годы микробиологические реакции часто применяются химиками в их синтетической работе в тех случаях, когда эти реакции позволяют повысить выход на какой-либо

стадии или сократить число стадий. Бернштейн с сотрудниками<sup>169</sup> в синтезе 16 $\alpha$ -окси-9 $\alpha$ -фторзамещенных стероидов использовали микробиологическое дегидрирование вместо дегидрирования при помощи  $\text{SeO}_2$ , что повысило выход по данной стадии с 13,5 до 41,2%:



При ферментации  $\Delta^9(11)$ -стероидов с *Corynebacterium simplex* ими был получен 9 $\beta$ , 11 $\beta$ -эпоксид:



Это лишь один из многих примеров такого рода.

Важное значение имеют микробиологические реакции для установления строения новых как естественных, так и синтетически полученных стероидов. Так, Фрид<sup>170</sup> доказал строение 16 $\alpha$ -оксипрогестерона, использовав микробиологическую деградацию боковой цепи и превратив его в 16 $\alpha$ -окситетостерон. 14 $\alpha$ -оксипрогестерон для доказательства его строения был микробиологически превращен в  $\Delta^4$ -андростенол-14 $\alpha$ -дион-3,17. Неер и Веттштейн<sup>171</sup> применяли микробиологические реакции для установления строения таких выделенных из надпочечников стероидов, как 6 $\beta$ -оксикортикостерон, 19-оксикортикостерон и др. Талалай и Харлок применяли очищенные стероидные дегидрогеназы для аналитической оценки стероидов в моче<sup>172</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

- L. Mamoli, A. Vercellone, Ber., **70**, 470 (1937).
- L. Mamoli, A. Vercellone, Ztschr. physiol. Chemie, **245**, 93 (1937).
- L. Mamoli, A. Vercellone, Ber., **71**, 1686 (1938).
- A. Kramli, J. Horvath, Nature, **162**, 619 (1948).
- D. H. Peterson, H. C. Murray, J. Am. Chem. Soc., **74**, 1871 (1952).
- E. A. Mistryukov, Coll. Czechosl. chem. Comm., **26**, 2071 (1961).
- V. Černý, J. Joska, L. Labler, Там же, **26**, 1658 (1961).
- G. Wix, K. Albrecht, Nature, **183**, 1279 (1959).
- R. M. Dodson, A. H. Goldkamp, R. D. Muir, J. Am. Chem. Soc., **82**, 4026 (1960).
- G. Greenspan, C. P. Schaffner, W. Charney, H. L. Herzog, E. B. Hershberg, Там же, **79**, 3922 (1957).
- W. J. McAleer, M. A. Kozlowski, T. H. Stoudt, J. M. Chemerda, J. Org. Chem., **23**, 508 (1958).
- M. Shirasaka, M. Tsuruta, Arch. Biochem. Biophys., **87**, 338 (1960).
- K. Tanabe, R. Hayashi, R. Takasaki, M. Shirasaka, Chem. Pharmac. Bull., **7**, 811 (1959).

14. J. Fried, R. W. Thoma, D. Perlman, J. E. Herz, A. Borman, Rec. Progr. in Hormone Research, **XI**, 149 (1955).
15. S. Shinichi, T. Masako, S. Makoto, N. Michikazu, Arch. Bioch. Biophys., **80**, 383 (1959).
16. D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub, L. M. Reineke, J. Am. Chem. Soc., **75**, 5768 (1953).
17. S. Bernstein, W. S. Allen, M. Heller, R. H. Lenhard, L. S. Feldman, R. H. Blank, J. Org. Chem., **24**, 286 (1959).
18. W. J. McAleer, M. A. Kozlowski, T. H. Stoudt, J. M. Chemerda, J. Org. Chem., **23**, 985 (1958).
19. A. Kramli, J. Horvath, Nature, **163**, 219 (1949).
20. T. Asai, T. Tanaki, E. Ohki, T. Matsuhisa, Y. Takeda, T. Juni, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **33**, 985 (1959).
21. S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray, D. H. Peterson, Vitamins and Hormones, **14**, 359 (1956).
22. F. W. Kahnt, P. D. Meystre, Exper., **8**, 422 (1952).
23. H. C. Murray, D. H. Peterson, Am. pat. 2602769 (1952).
24. R. M. Dodson, R. T. Nicholson, P. D. Muir, J. Am. Chem. Soc., **81**, 6295 (1959).
25. S. H. Eppstein, Exper., **11**, 465 (1955).
26. D. Stone, M. Hayano, R. J. Dorfman, O. Hechter, C. R. Robinson, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., **77**, 3926 (1955).
27. A. Schubert, D. Onken, R. Siebert, K. Heller, Ber., **91**, 2549 (1958).
28. H. C. Murray, D. H. Peterson, Am. pat. 2888384 (26.05.1959); C. A., **53**, 20143a (1959).
29. A. Bowers, C. Casas-Campilo, C. Djerassi, Tetrahedron, **2**, 165 (1958).
30. D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister, H. M. Leigh, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5933 (1952).
31. J. Fried, R. W. Thoma, J. R. Gerke, J. E. Herz, M. N. Donin, D. Perlman, Там же, **74**, 3962 (1952).
32. E. L. Dulaney, W. J. McAleer, H. R. Barkemeyer, C. Hlavak, Appl. Mikrobiol., **3**, 372 (1955).
33. P. D. Meister, L. M. Reineke, R. C. Meeks, H. C. Murray, S. Eppstein, H. M. Leigh, A. Weintraub, D. H. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4050 (1954).
34. E. Weisz, G. Wix, M. Bodansky, Naturwiss., **43**, 39 (1956).
35. P. D. Meister, D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, H. M. Leigh, J. Am. Chem. Soc., **75**, 55 (1953).
36. D. H. Peterson, A. H. Nathan, P. D. Meister, S. H. Eppstein, H. C. Murray, A. Weintraub, L. M. Reineke, H. M. Leigh, Там же, **75**, 419 (1953).
37. S. H. Eppstein, D. H. Peterson, H. M. Leigh, H. C. Murray, A. Weintraub, L. M. Reineke, P. D. Meister, Там же, **75**, 421 (1953).
38. A. Ercoli, P. de Ruggieri, D. Della Morte, Gazz., **85**, 628 (1955).
39. D. H. Peterson, P. D. Meister, A. Weintraub, L. M. Reineke, S. H. Eppstein, H. C. Murray, H. M. Leigh, J. Am. Chem. Soc., **77**, 4428 (1955).
40. V. Prelog, W. Acklin, Helv. chim. Acta, **39**, 748 (1956).
41. D. N. Kirk, V. Petrow, M. H. Williamson, J. Chem. Soc., **1960**, 3872.
42. R. D. Muir, R. M. Dodson, Am. pat. 2823170 (11.02.1958); РЖХим., **1960**, 39841 П.
43. P. D. Meister, A. Weintraub, Am. pat. 2877162 (10.03.1959); РЖХим., **1961**, 5Л390.
44. A. Weintraub, P. D. Meister, Am. pat. 2879206 (24.03.1959).
45. Kurosawa Juichiro, J. Agric. Chem. Soc. Japan, **32**, 515 (1958).
46. D. R. Colingsworth, M. P. Brunner, W. J. Haines, J. Am. Chem. Soc., **74**, 2381 (1952).
47. G. M. Shull, D. A. Kita, Там же, **77**, 763 (1955).
48. E. L. Dulaney, E. O. Stapley, Appl. Microbiol., **7**, 276 (1959).
49. K. Mann, F. Hanson, P. Connell, H. V. Anderson, M. P. Brunner, J. N. Karnemaaat, Там же, **3**, 14 (1955).
50. P. W. O'Connell, K. M. Mann, E. D. Nielson, Там же, **3**, 16 (1955).
51. J. W. Davison, Am. pat. 2830937 (1958); РЖХим., **1960**, 78496 П.
52. R. W. Thoma, J. R. Gerke, J. Fried, Am. pat. 2793163 (21.05.1957); РЖХим., **1960**, 6211 П.
53. I. L. Sardinas, G. M. Shull, Am. pat. 2876160 (1959).
54. H. Nawa, M. Uchibayashi, R. Takeda, J. Nakanishi, T. Kusaska, J. Terumichi, M. Uchida, M. Katsumata, K. Yoshino, H. Fujitani, Tetrahedron, **4**, 201 (1958).
55. J. Schmidt-Thome, Ang. Chem., **69**, 238 (1959).
56. A. Schubert, G. Langbein, R. Siebert, Ber., **90**, 2576 (1957).
57. A. Gible, Ch. Tam, Helv. Chim. Acta, **41**, 297 (1958).
58. A. Gible, Ch. Tam, Chimia, **13**, 116 (1959).
59. N. Masamoto, H. Hikoichi, Pharmac. Soc. Japan, **78**, 1256 (1958).

60. J. Fried, R. W. Thoma, D. Perlman, J. E. Herz, A. Borman, Recent. Progr. in Hormone Research, **11**, 149 (1955).
61. M. Shirasaka, R. Hayashi, M. Tsuruta, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **23**, 244 (1959).
62. A. Gribler, Ch. Tamam, Helv. Chim. Acta, **41**, 301 (1958).
63. H. C. Murray, P. D. Meister, Am. pat. 2889255 (2.06.1959); РЖХим., **1960**, 97773 II.
64. J. Fried, R. W. Thoma, D. Perlman, J. R. Gerke, Am. pat. 2879280 (24.03.1959); РЖХим., **1960**, 39853 II.
65. S. Bernstein, L. I. Feldman, W. S. Allen, R. H. Blank, C. E. Linden, Chem. and Ind., **1956**, 111.
66. H. L. Herzog, M. J. Gentles, W. Charney, D. Sutter, E. Townley, M. Yudins, P. Kabasakalian, E. B. Hershberg, J. Org. Chem., **24**, 691 (1959).
67. K. Tanabe, R. Takasaki, T. Hayashi, M. Shirasaka, Chem. and Pharmac. Bull., **7**, 804 (1959).
68. D. Perlman, E. O'Brien, A. R. Bayem, R. B. Greenfield, J. Bacteriol., **69**, 347 (1955).
69. R. W. Thoma, J. Fried, S. Bonanno, P. Grabowich, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4818 (1957).
70. S. Bernstein, R. H. Lenhard, N. E. Rigler, M. A. Darken, J. Org. Chem., **25**, 297 (1960).
71. J. Fried, D. Perlman, A. F. Langlykke, E. O. Titus, Am. pat. 2872381 (3.02.1959); РЖХим., **1960**, 93565 II.
72. H. L. Herzog, M. J. Gentles, A. B. Coscarelli, A. Basch, M. E. A. Zeitz, W. Charney, J. Org. Chem., **25**, 2177 (1960).
73. E. L. Dulaney, W. J. McAleer, Am. pat. 2819200 (7.01.1958); РЖХим., **1960**, 10515 II.
74. W. McAleer, E. L. Dulaney, Am. pat. 2875132 (24.02.1959).
75. Ch. Meystre, E. Vischer, A. Wettstein, Helv. chim. Acta, **37**, 1548 (1954).
76. E. L. Dulaney, W. J. McAleer, Am. pat. 2863806 (27.12.1955).
77. W. J. McAleer, E. L. Dulaney, Am. pat. 2831798 (22.04.1958); РЖХим., **1960**, 32008 II.
78. Швейц. пат. 330669, цит. по Chimia, **13**, 36 (1959).
79. M. Nishikawa, H. Hagiwara, Chem. and Pharmac. Bull., **6**, 226 (1958).
80. A. Zaffaroni, C. Casas-Campillo, F. Cordobe, G. Rosenkranz, Exper., **11**, 219 (1955).
81. W. McAleer, E. L. Dulaney, Am. pat. 2875132 (24.02.1959); C. A., **53**, 16223a (1959).
82. E. Vischer, J. Schmidlin, A. Wettstein, Exper., **12**, 50 (1956).
83. B. M. Bloom, G. M. Shull, J. Am. Chem. Soc., **77**, 5767 (1955).
84. D. Perlman, E. Titus, J. Fried, Там же, **74**, 2126 (1952).
85. Z. Prochazka, J. Faikoš, J. Joška, F. Šorm, Coll. Czechosl. Chem. Comm., **26**, 2068 (1961).
86. B. Camerino, R. Modelli, Gazz., **86**, 1219 (1956).
87. B. Camerino, R. Modelli, Gazz., **86**, 1226 (1956).
88. B. Camerino, R. Sciaky, Gazz., **89**, 654 (1959).
89. Неопубл., цит. по Vitamins and Hormones, **14**, 359 (1956).
90. В. К. Ерошин, Н. А. Красильников, ДАН, **137**, 968 (1961).
91. О. Нанč, E. Jirat, A. Сарек, M. Tadra, Chem. Listy, **1957**, 51 (1950).
92. G. E. Turfitt, Biochem. J., **38**, 492 (1944).
93. G. E. Turfitt, Там же, **40**, 79 (1946).
94. M. Shirasaka, R. Takasaki, M. Suruta, Nature, **186**, 390 (1960).
95. W. M. Hoehn, L. N. Schmidt, H. B. Hughes, J. Biol. Chem., **152**, 59 (1944).
96. E. Vischer, A. Wettstein, Exper., **9**, 371 (1953).
97. E. Vischer, Ch. Meystre, A. Wettstein, Helv. chim. Acta, **38**, 835 (1955).
98. M. Nisikawa, T. Hasegawa, S. Noguti, H. Hagiwara, Яп. пат. 528 (9.02.1959).
99. E. Vischer, A. Wettstein, Adv. Enzym., **20**, 263 (1958).
100. Н. А. Красильников, Г. К. Скрябин, И. В. Асеева, Л. О. Корсунская, ДАН, **128**, 1063 (1959).
101. Н. А. Красильников, Г. К. Скрябин, И. В. Асеева, Л. О. Корсунская, ДАН, **128**, 863 (1959).
102. R. Takeda, J. Nakanishi, J. Terumichi, N. Uchida, M. Katsumata, M. Uchibayashi, H. Nawa, Tetrahedron letters, **4**, 17 (1959).
103. W. Charney, Доклад в Ин-те микробиологии АН СССР; цит. по А. Г. Байчиников, А. С. Барменков, В. К. Ерошин, Мед. промышл. СССР, **1959**, № 6, 15.
104. S. A. Szilifogel, P. A. Van Hemert, M. S. de Winter, Rec. trav. chim., Pays-Bas, **75**, 1227 (1956).
105. J. Fried, R. W. Thoma, A. Klingsberg, J. Am. Chem. Soc., **75**, 5764 (1953).
106. C. Guai, S. R. Stitch, M. Gut, R. J. Doriman, J. Org. Chem., **24**, 418 (1959).
107. G. M. Shull, Am. pat. 2876171 (3.03.1959); РЖХим., **1960**, 62601п.

108. J. Horvath, A. Kramli, *Nature*, **160**, 639 (1947).
109. O. K. Sebek, L. M. Reineke, D. H. Peterson, R. C. Meeks, P. D. Meister, S. H. Eppstein, J. P. Rosselet, A. Weintraub, H. C. Murray, *Chem. and Ind.*, **1958**, 391.
110. S. Kushinski, *J. Biol. Chem.*, **230**, 31 (1958).
111. D. H. Peterson, L. M. Reineke, H. C. Murray, O. K. Sebek, *Chem. and Ind.*, **1960**, 1301.
112. J. A. Zderic, A. Bowers, H. Carpio, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2596 (1958).
113. H. L. Herzog, A. Nobile, *Am. pat.* 2928850; *РЖХим.*, **1961**, 8Л416.
114. R. M. Dodson, R. D. Muir, *Там же*, **80**, 6148 (1958).
115. A. Vercellone, L. Mamoli, *Ztschr. Physiol. Chem.*, **248**, 277 (1937).
116. L. Mamoli, *Am. pat.* 2186906 (9.01.1940).
117. O. K. Sebek, R. M. Michaels, *Nature*, **179**, 210 (1957).
118. O. Hanč, A. Čapek, M. Tadra, *Чехосл. пат.* 86728 (15.07.1957); *РЖХим.*, **1960**, 43881 П.
119. F. Lindner, R. Junk, G. Nesemann, J. Schmidt-Thome, *Ztschr. physiol. Chem.*, **313**, 117 (1958).
120. Л. М. Коган, М. С. Оранская, Н. Н. Суворов, Г. К. Скрябин, И. В. Торгов, *Изв. АН СССР, ОХН*, 302 (1962).
121. D. Gould, J. Havsky, R. Guttenkunst, E. B. Hershberg, *J. Org. Chem.*, **22**, 829 (1957).
122. L. L. Smith, J. J. Garbarini, J. J. Goodman, M. Marx, H. Mendelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1437 (1960).
123. M. Uchibayashi, *Chem. Pharmac. Bull.*, **8**, 112 (1960).
124. Н. Н. Суворов, В. М. Новикова, Л. В. Соколова, Н. Ф. Ковылкина, *Мед. пром. СССР*, **1960**, № 1, 22.
125. Л. В. Соколова, В. М. Рыжкова, Г. К. Скрябин, Н. Н. Суворов, *Там же*, **1961**, № 11, 29.
126. Неопубл., цит. по *Perspektives and Horizons in Microbiology*, Rutgers University Press, 1955 стр. 121.
127. L. Mamoli, R. Koch, H. Teschen, *Ztschr. physiol. Chem.*, **261**, 287 (1939).
128. E. Vischer, A. Wettstein, *Exper.*, **16**, 355 (1960).
129. D. H. Gould, E. B. Hershberg, E. Schapiro, *Am. pat.* 2864835 (16.12.1958); *РЖХим.*, **1960**, 58382 П.
130. Н. Н. Суворов, Л. В. Соколова, В. М. Рыжкова, Д. М. Зайкина, *ДАН*, **132**, 1325 (1960).
131. K. Zetsche, *Naturwiss.*, **48**, 407, (1961).
132. R. Thoma, J. Fried, *Am. pat.* 2793162 (1957).
133. A. Čapek, O. Hanč, K. Maček, M. Tadra, Riedl-Tumowá, *Naturwiss.*, **43**, 471 (1956).
134. G. M. Shull, J. B. Routien, *Am. pat.* 2866737 (30.12.1958); *РЖХим.*, **1960**, 43880 П.
135. G. M. Shull, J. B. Routien, *Am. pat.* 2872380 (3.02.1959).
136. Швейц. пат. 363380/1 (1959).
137. G. S. Fonken, H. C. Murray, L. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5507 (1960).
138. J. S. McGuire, E. S. Maxwell, G. M. Tomkins, *Bioch. Biophys. Acta*, **45**, 312 (1950).
139. C. E. Holmlund, L. J. Feldman, N. E. Rigler, B. E. Nielsen, R. H. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2586 (1961).
140. K. Schubert, K. H. Böhme, C. Hörrhold, *Naturforsch.*, **1960**, 15b, 584.
141. R. M. Dodson, R. D. Muir, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4627 (1961).
142. R. M. Dodson, R. D. Muir, *Там же*, **83**, 4631 (1961).
143. L. L. Smith, M. Marx, J. J. Garbarini, T. Foell, V. E. Origoni, J. J. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4616 (1960).
144. J. J. Goodman, L. L. Smith, *Appl. Microbiol.*, **8**, 363 (1960).
145. J. J. Goodman, L. L. Smith, *Там же*, **9**, 372 (1961).
146. P. Talalay, M. M. Dobson, D. T. Tapley, *Nature*, **170**, 620 (1952).
147. P. Talalay с сотрудниками, *Cancer*, **10**, 738 (1957).
148. H. R. Levy, P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2014 (1959).
149. F. S. Kawahara, P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **235**, PC I (1960).
150. A. Fieret, H. P. Klein, *J. Bacteriol.*, **78**, 738 (1959).
151. E. Vischer, A. Wettstein, неопубл., цит. по *Adv. Enzym.*, **20**, 264 (1958).
152. A. Čapek, H. Pavlů, O. Hanč, *Folia biol. (Ceskosl.)*, **4**, 337 (1958).
153. A. Čapek, H. Pavlů, O. Hanč, *Naturwiss.*, **45**, 89 (1958).
154. G. Lester, D. Stone, O. Hechter, *Arch. Bioch. Biophys.*, **75**, 196 (1958).
155. F. S. Maxwell, J. S. McGuire, G. M. Tomkins, *J. Bacteriol.*, **80**, 1 (1960).
156. D. Perlman, M. J. Weistein, G. E. Peterson, *Canad. J. Microbiol.*, **3**, 841 (1957).
157. B. Hurlock, P. Talalay, *J. Biol. Chem.*, **233**, 886 (1958).
158. P. Talalay, V. S. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 300 (1955).

159. H. J. Hübener, C. O. Lehmann, Ztschr. physiol. Chem., **313**, 124 (1958).  
 160. K. Zetsche, Naturwiss., **47**, 232 (1960).  
 161. M. Hayano, M. Gut, R. J. Dorfman, O. K. Sebek, D. H. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **80**, 2336 (1958).  
 162. E. J. Corey, G. A. Gregorio, D. H. Peterson, Там же, **80**, 2338 (1958).  
 163. F. Lindner, R. Junk, H. Kehl, G. Nesemann, J. Schmidt-Thome, Naturwiss., **43**, 39 (1956).  
 164. H. Murray, Ам. пат. 2902411 (1959); С. А., **54**, 1660а (1960).  
 165. K. Zetsche, Arch. Microbiol., **38**, 237 (1961).  
 166. A. Revol, C. Nofre, A. Cierg, С. г., **247**, 2486 (1958).  
 167. А. Г. Тимофеева, А. С. Барменков, М. В. Федотова, Мед. промышл. СССР, **1957**, № 7, 23.  
 168. W. J. McAleer, Ам. пат. 2875132 (1959); С. А., **53**, 16223а (1959).  
 169. S. Bernstein, R. H. Lenhard, W. S. Ailen, M. Heller, R. Littell, S. M. Stolar, L. Feldman, R. Blank, J. Am. Chem. Soc., **81**, 1689 (1959).  
 170. J. Fried, R. W. Thoma, F. F. Sabo, P. Grabowicz, неопубл. цит. по <sup>151</sup>.  
 171. R. Neher, A. Wetttstein, Helv. chim. Acta, **39**, 2062 (1956).  
 172. B. Hurlock, P. Talalay, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **93**, 560 (1956).

Институт химии природных соединений  
АН СССР