

УДК 547,92;542.98;579.61

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5α -Н-СТЕРОИДОВ

Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В.

Обобщены литературные данные об использовании микроорганизмов для гидроксилирования 5α -Н-стериоидов 5α -Н-андростанового и 5α -Н-прегнанового рядов и 5α -Н-сапогенинов. Представлена систематизированная картина о влиянии замещения в стероидной молекуле на направленность гидроксилирования и активность микробных ферментов в рамках модели фермент-субстратного взаимодействия.

Библиография — 124 ссылки.

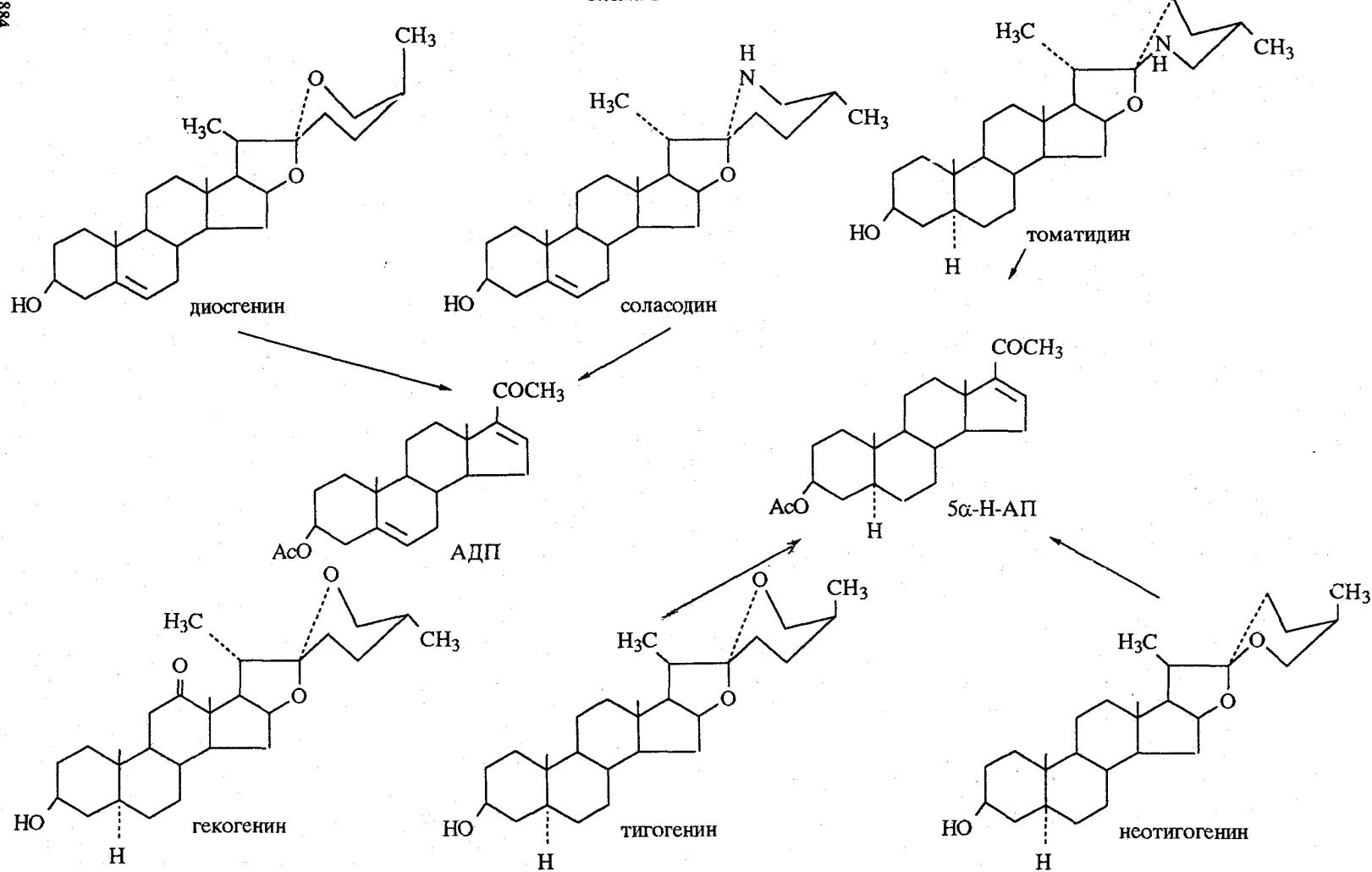
ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1883
II. Гидроксилирование 5α -Н-сапогенинов	1885
III. Гидроксилирование 5α -Н-андростанов	1888
IV. Трансформация галогензамещенных 5α -Н-андростанов	1911
V. Гидроксилирование 5α -Н- <i>D</i> -гомоандростанов	1913
VI. Гидроксилирование 5α -Н-прегнанов	1919

I. ВВЕДЕНИЕ

Промышленное производство кортикостероидов базируется в настоящее время в основном на диосгенине, соласодине и полупродукте их расщепления — 3β -ацетате 16-дегидропрегненолона (АДП). Расширение объема производства стероидов испытывает существенные трудности в связи с резким возрастанием цен на это сырье, закупаемое в странах с тропическим климатом. Единственным собственным промышленным источником стероидного сырья служит соласодин, потребность в котором в странах СНГ не удовлетворяется. В связи с этим в качестве перспективных альтернативных источников все чаще рассматриваются 5α -Н-стериоиды — гекогенин, тигогенин, неотигогенин [1] и получаемый из них 3β -ацетокси- 5α -Н- Δ^{16} -прегнен-20-он (5α -Н-АП), которые пока не могут конкурировать с их Δ^5 -аналогами из-за насыщенности колец *A* и *B*, трудно трансформируемых химическими способами в практически полезные Δ^4 - и $\Delta^{1,4}$ -3-кетозамещенные стероидные препараты (схема 1). К настоящему времени накопились данные о возможностях микробиологических методов эффективной трансформации (гидроксилирования и дегидрирования) 5α -Н-стериоидов. Однако они никогда не систематизировались и поэтому недоступны для осознанного практического применения. Более того, большая их часть относится к 5α -Н-андростановому ряду, а значительно меньшая — к 5α -Н-прегнановому ряду, практическая значимость которого несопоставимо выше. Тем не менее, при ближайшем рассмотрении оказывается, что между этими рядами существует близкая аналогия, позволяющая проводить сопоставление результатов и их априорное перенесение с андростанового на прегнановый ряд. Основной целью обзора является представление систематизированной картины, отражающей влияние заместителей в различных положениях стероидного ядра на процесс микробиологического гидроксилирования 5α -

Схема 1



Н-стериоидов; за его рамками остается рассмотрение трансформаций кольца A 5 α -Н-стериоидов с помощью микробиологического дегидрирования с последующим 9 α -гидроксилированием, осуществляемыми бактериями. В рамках этого обзора нам представляется также нецелесообразным привлечение к рассмотрению данных по трансформации 5 β -Н-стериоидов, которые не только менее доступны, но и структурно несопоставимы. Так, известно, что пространственная изомерия при атоме C(5), контролирующая сочленение колец A и B, является одним из наиболее важных факторов, влияющих на взаимодействие стероидных субстратов со стероид-гидроксилазами [2]. Проиллюстрируем сказанное примерами андростерона и его 3 β -гидроксизомера, гидроксилирующихся плесенью *Penicillium* sp. соответственно в 1 α - и 12 β -положения. Их A/B-цис-аналоги, независимо от конфигурации 3-оксигруппы гидроксилируются только в 7 β -положение [3]. Плесень *Aspergillus tamarii* гидроксилирует андростерон и его 3 β -гидроксизомер в 11 β - и 11 α -положения, тогда как их A/B-цис-аналоги — в 7 β -положение [4]. Еще пример для соединений pregnанового ряда: 16 α , 17 α -элокси-5 α -Н-прегнан-3-он трансформируется с помощью *Rhizopus nigricans* в 11 α -гидроксипроизводное (60%), а его 5 β -Н-изомер трансформируется, хотя и в том же направлении, но с большим трудом [5]. Критическое изменение стереохимии субстрата (A/B-транс на A/B-цис) безусловно влияет на пространственную структуру фермент-субстратного комплекса; этот фактор, как видно из сказанного выше, становясь определяющим, требует самостоятельного рассмотрения.

Исследования микробиологических превращений стериоидов относятся в основном к соединениям с Δ^4 -3-кето- или Δ^5 -3 β -гидроксигруппировками и обобщены в работах [2,6—11]. При этом усилия многих исследователей были направлены на изучение механизма микробиологических трансформаций, специфиности действия микроорганизмов в зависимости от положения в системе классификации и от стереохимических особенностей стероидных субстратов. Изучение механизма гидроксилирования в отличие от дегидрирования осложняется высокой лабильностью стероид-гидроксилаз [12]. Остается невыясненным вопрос о том, почему одна и та же культура меняет направление гидроксилирования при смене стероидного субстрата. Не является ли это следствием функционирования в клетке различных ферментов? Не установлены окончательно причины микробиологического гидроксилирования стериоидов. Согласно существующим гипотезам, микробиологическая трансформация стериоидов в некоторых случаях вызвана необходимостью их детоксикации, в других случаях она происходит как этап ассимиляции стериоидов в качестве источника углерода. Последнее подтверждается на примере бактериального гидроксилирования. Бактерии начинают расщепление стероидной молекулы с гидроксилирования в положении 9 α , 22 и 26. Однако нет данных о причинах свойственного стрептомицетам гидроксилирования в положение 16 α [6—11]. За исключением приведенных примеров гидроксилирования шизомицетами, в подавляющем большинстве случаев гидроксилирование стериоидов выполнено с помощью представителей всех классов грибов в положения 1 α , 1 β , 2 α , 2 β , 3 β , 4 β , 5 β , 6 α , 6 β , 7 α , 7 β , 8 β , 9 α , 10 β , 11 α , 11 β , 12 α , 12 β , 14 α , 15 α , 15 β , 16 α , 16 β , 17 α , 18, 21 [6—11]. В данной работе, которая является первой попыткой систематизации и анализа разрозненных сведений о трансформации 5 α -Н-стериоидов, включая результаты 1992 г., рассматриваются примеры гидроксилирования только грибными культурами. Все виды грибов, использованные для трансформации 5 α -Н-стериоидов, представлены в табл. 1.

II. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5 α -Н-САПОГЕНИНОВ

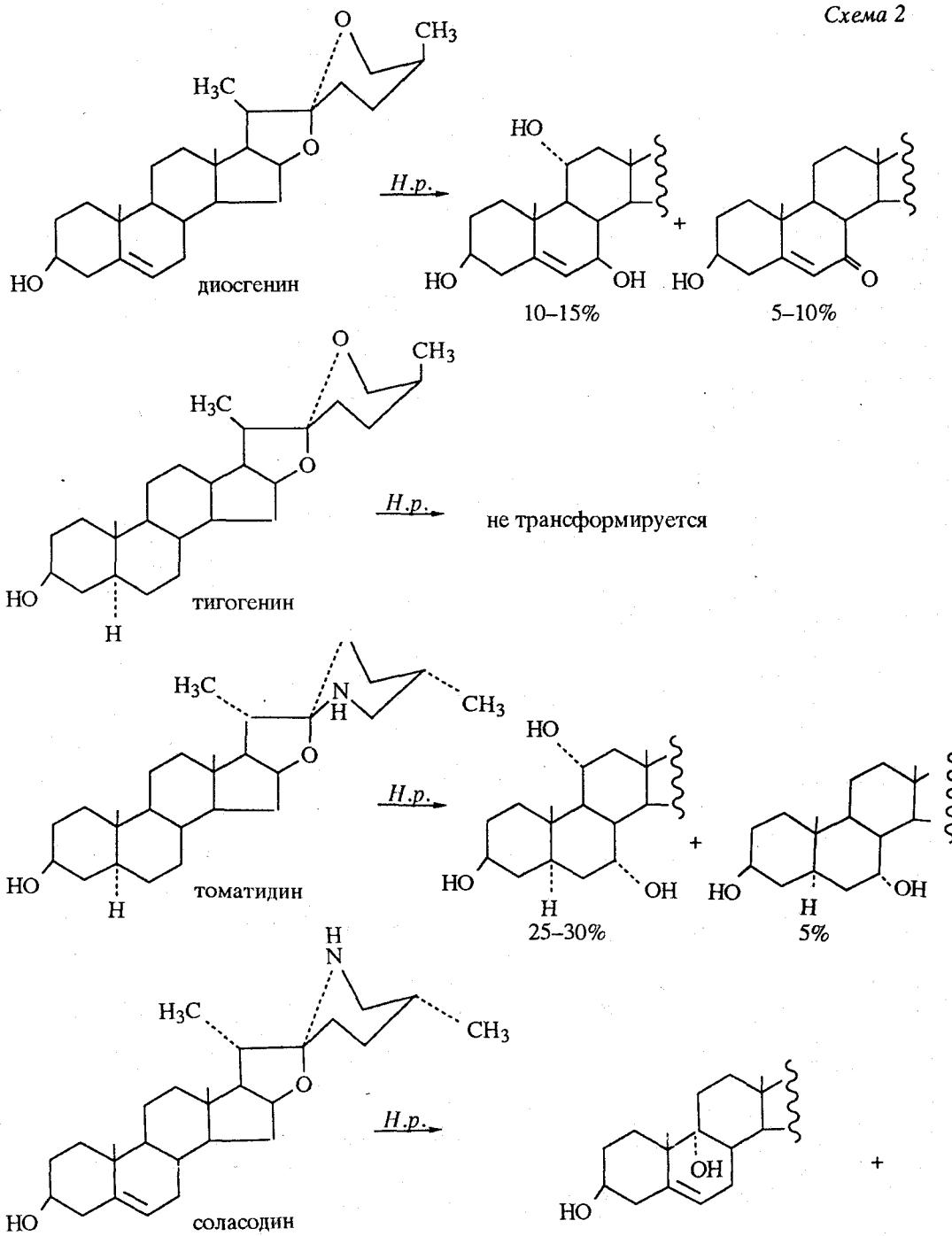
После открытия способности низших грибов гидроксилировать прогестерон [39] был предпринят ряд попыток получить микробиологическим способом гидроксилированные стероидные сапогенины, поскольку они рассматривались как перспективные исходные субстраты в синтезе стероидных гормонов (схема 1). Первые результаты осуществления подобных трансформаций были отрицательными, несмотря на то, что

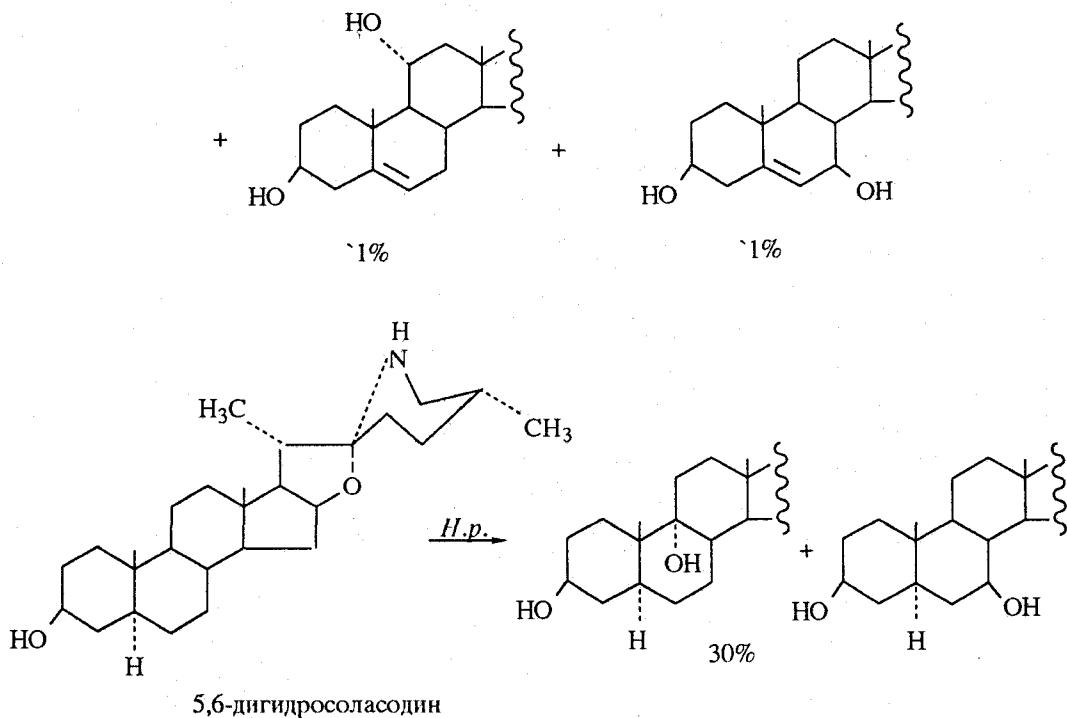
Таксономия грибов, гидроксилирующих 5 α -Н-стероиды

Класс	Род	Вид	Сокращенное обозначение	Ссылки
Ascomycetes	Calonectria	decora	C.d.	[13, 16, 19, 20, 29, 30, 34—36, 100—103]
	Diaporthe	celastrina	D.c.	[31]
	Didymella	vodakii	D.v.	[64]
	Glomerella	cingulata	Gl.c.	[58]
		fusaroides	Gl.f.	[58]
		lagenarium	Gl.l.	[58]
	Gymnoascus	reesii	G.r.	[97]
	Ophiobolus	herpotrichus	O.h.	[27]
	Corticium	praticola	C.pr.	[38]
	Daedalea	rufescens	D.r.	[28, 35]
Basidiomycetes	Hypholoma	sublateritium	H.s.	[99]
	Leptotorpus	fissilis	L.f.	[37]
	Polystictus	sanguineus	P.s.	[38]
	Aspergillus	nidulans	A.n.	[38]
		ochraceus	A.o.	[17, 18, 21, 25, 26, 29, 34, 36, 38, 68, 80, 93, 98, 111]
Deuteromycetes		tamarii	A.t.	[4]
	Beauveria	sp.	B.sp	[62]
	Chaetomella	oblonga	Ch.o.	[113]
		raphigera	Chr.	[113]
	Curvularia	clavata	C.cl.	[82, 87, 88, 117]
		lunata	C.l.	[59, 61, 65, 68, 105—107]
	Epicoccum	humicola	E.h.	[114]
		neglectum	E.n.	[114]
		oryzae	E.o.	[114]
		yuccae	E.u.	[114]
	Fusarium	graminearum	F.g.	[71]
		sulfureum	F.s.	[57]
	Gliocladium	roseum	G.r.	[116]
	Phoma	sp.	Ph.sp.	[60]
	Penicillium	sp.	P.sp.	[3, 70, 77]
		urticae	P.u.	[18]
	Pestalotia	fumigata	P.f.	[64, 110]
	Spondylocladium	australe	Sp.a.	[66]
		xylogenum	Sp.x.	[66]
	Sporotrichum	epigaeum	S.e.	[63]
Phycomycetes		sulfurescens	S.s.	[55, 63]
	Wojnowicia	graminis	W.g.	[27]
	Absidia	regnieri	A.r.	[33]
	Circinella	sp.	C.sp.	[67]
	Cokeromyces	recurvatus	C.r.	[115]
	Cunninghamella	blakesleeana	C.bl.	[107]
		baininieri	C.b.	[124]
		elegans	C.el.	[47, 89—96]
	Helicostylum	piriforme	H.p.	[41—46, 84, 86, 87]
	Mucor	griseo-cyanus	M.g.-c.	[56]
	Thioghermella	orchidis	T.o.	[107]
	Rhizopus	arrhizus	R.a.	[24, 35, 38, 54, 69]
	Rhizopus	circinans	R.c.	[24, 35]
		nigricans	R.n.	5, 14, 22, 23, 26, 29, 34—36, 54, 79, 81, 111, 112]
	Syncephalastrum	racemosum	S.r.	[33, 85]

для этой цели изучали довольно широкий круг микроорганизмов и условий их культивирования [40]. Однако позже японские ученые получили с помощью фикомицетов *H.p.* гидроксипроизводные как Δ^5 -, так и 5α -Н-сапогенинов (диосгенина, томатидина, соласодина, 5,6-дигидроксоласодина) [41–46]. Заслуживает внимания факт однотипности протекания трансформации диосгенина и 5α -Н-стeroидного алкалоида — томатидина — и полное отсутствие микробиологического превращения тигогенина в сравнении с диосгенином (схема 2) [44].

Схема 2





Основное направление гидроксилирования определяется структурой субстрата. Диосгенин и томатидин трансформируются преимущественно с образованием 11 α -гидроксипроизводных, а соласодин и 5,6-дигидросоласодин — с образованием 9 α -гидроксипроизводных [41, 46]. Следует подчеркнуть, что при трансформации томатидина культурой *H.p.* атом азота в кольце *F* не препятствует 11 α -гидроксилированию.

Повторная попытка получить гидроксипроизводные из 5 α -спиростанолов предпринята через 20 лет после указанных выше работ. С помощью *C. el.* получены 1 β , 7 β -дигидроксипроизводные гекогенина [47]. В отличие от *H.p.* и *C.el.* исследованные культуры грибов *Gymnoascus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Dendrostibella*, *Nyrotutes* не гидроксилируют 5 α -Н- и Δ^5 -сапогенины, а подобно бактериям трансформируют кольцо *A* и расщепляют боковую цепь [48—53].

III. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5 α -Н-АНДРОСТАНОВ

Наиболее широко исследованными на гидроксилирование грибами явились 5 α -Н-андростаны. Анализ результатов трансформаций различных 5 α -Н-андростанов (монокетоны, дикетоны, кетоспирты), выбранных в качестве простейших модельных соединений для интерпретации поведения микроорганизмов, позволил сделать основные выводы относительно механизма микробиологического гидроксилирования стероидов. Гидроксилирующая активность по отношению к 5 α -Н-андростанам исследована у грибов различных классов аскомицетов, базидиомицетов, дейтеромицетов и фикомицетов, у которых известна способность к гидроксилированию Δ^4 -3-кетостероидов в положении: 11 α — *A.o.*, *R.p.*, 11 β — *C.cl.* *C.cl.*, 12 β , 15 α — *c.d.*, *P.u.*, *P.sp.*, 21 — *W.g.*, *O.h.* [2, 6, 7]. Проверены также ранее не исследованные культуры *A.t.* [4], *D.r.* [28], *A.r.* [33], *L.f.* [37], *D.c.* [31], *R.c.* [24]. Результаты этих исследований представлены в табл. 2 и 3. При оценке данных табл. 2 следует обратить внимание на

Таблица 2

Гидроксилирование 5 α -Н-андростанов грибами

Заместители в субстрате	Микро-организм	Исходное, %	Основные направления	Выход, %	Побочные направления	Выход ^a , %	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7	8
2,7-(CO) ₂	L.f.	15	16 β	22	16 β , 18	6	[37]
2,7-(CO) ₂	W.g.	15	2 β , 17 β	19	17 β 2 β , 18	9 10	[27]
3-CO	A.o.	56	6 β , 11 α	51	11 α	11	[21]
3-CO	A.r.	55	9 α , 15 β	8	9 α	4	[33]
3-CO	W.g.	72	9 α , 17 β	13	—	—	[27]
3-CO	D.r.	90	не трансформируется	—	—	—	[28]
17-CO	A.o.	65	7 β , 11 α	27	—	—	[21]
3,6-(CO) ₂	D.r.	9	3 β , 16 β	39	3 β , 15 β 3 β , 6 α , 16 β	12 25	[28]
3,6-(CO) ₂	L.f.	21	16 β	12	3 β , 16 β	8	[37]
3,7-(CO) ₂	W.g.	32	3 β , 17 β	41	3 α , 17 β	27	[27]
3,7-(CO) ₂	L.f.	4	16 β , 18	7	3 β , 18	5	[37]
3,7-(CO) ₂	O.h.	12	3 β , 17 β	62	—	—	[27]
3,7-(CO) ₂	A.r.	0	3 β , 11 α	6	Δ^{1-17} -CO 11 α	3 1	[33]
3,7-(CO) ₂	S.r.	3	3 β , 12 α	13	7 α , 9 α	5	[33]
		3	3 β , 12 β	6	1 β 11 α 12 α 7 α , 9 α , 11 α	3 2 2 2	
3,7-(CO) ₂	D.c.	7	3 β , 16 α	48	3 β , 16 β	11	[31]
3,7-(CO) ₂	R.a.	3	16 β	15	16 α	3	[24]
			3 β , 16 β	31	11 α , 16 β 17 α	3 2	
3,7-(CO) ₂	R.c.	7	3 β , 11 α	22	11 α , 16 β	5	[24]
			16 β	10	3 β , 16 β	6	
3,7-(CO) ₂	D.r.	3	3 β , 7 α , 16 β	33	3 β , 7 α , 16-CO 3 β , 7 β , 16 β	3 13	[28]
3,11-(CO) ₂	A.r.	0	17 β , ($\Delta^{1,4}$)	6	16 β ($\Delta^{1,4}$) 17-CO ($\Delta^{1,4}$) 16-CO	4 2 2	[33]
3,11-(CO) ₂	S.r.	—	16 β ($\Delta^{1,4}$)	18	17 β ($\Delta^{1,4}$) 17-CO ($\Delta^{1,4}$)	9 9	[33]
3,11-(CO) ₂	D.c.	0	3 β , 16 α	55	16 α	18	[31]
3,11-(CO) ₂	R.c.	17	6 α	20	3 β , 11, 16-(CO) ₂	10	
			16 β	15	3 β , 7 β	3	[24]
			7 β	10	9 α , 16 β	2	
3,11-(CO) ₂	D.r.	5	3 β , 16 β	28	3 β , 15 β	15	[28]
3,11-(CO) ₂	L.f.	11	16 β	13	16 β , 18	5	[37]
3,11-(CO) ₂	R.a.	16	3 β , 16 β	22	16 β	7	[24]
			9 α , 16 β	23	9 α , 16 α	7	
3,11-(CO) ₂	O.h.	46	16 β	11	16-CO	38	[27]
			17 β	11	16-CO, 3 β	21	

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
3,11-(CO) ₂	W.g.	24	17 β	28	3 α , 17 β 3 β , 17 β 3 β , 16 β	8	[27]
3,11-(CO) ₂	P.u.	—	15 α 3 β , 15 α	31 15	—	—	[18]
3,16-(CO) ₂	L.f.	15	18	16	—	—	[37]
3,17-(CO) ₂	W.g.	7	1 α , 17 β 1 α , 3 β	7 6	1 α , 3 α , 9 α , 7 β 7 α	1 1	[27]
3,17-(CO) ₂	S.s.	—	11 α	22	3 β	7	[55]
3,17-(CO) ₂	A.r.	0	9 α 7 α , 9 α	14 13	3 β , 9 α 7 α	5 10	[33]
3,17-(CO) ₂	A.r.	—	9 α	11	7 α 1 β , 9 α	2,4 0,7	[33]
3,17-(CO) ₂	C.cl.	—	11 β	—	7 α	—	[82]
3,17-(CO) ₂	D.c.	6	3 β , 9 α	6	9 α	3	[31]
3,17-(CO) ₂	S.r.	0	3 β , 7 α 3 β , 7 α , 17 β	7 3	3 β 3 β , 9 α	7 2	[33]
3,17-(CO) ₂	D.r.	0	3 β , 7 β , 17 β	24	3 β , 11 α , 17 β 3 β , 6 α , 17 β	13 11	[28]
3,17-(CO) ₂	A.o.	—	11 α	66	—	—	[21, 93]
3,17-(CO) ₂	A.t.	—	6 β 11 β	25 ^b 30 ^b	— —	—	[4]
3,17-(CO) ₂	P.sp.	—	1 α	17	—	—	[70]
6-CO	D.r.	21	3 β , 6 α , 16 β	16	3 β , 6 α , 16-CO 3 β , 16 β 3 β , 15 β	5 4 2	[28]
6,17-(CO) ₂	L.f.	17	2 β	13	—	—	[37]
7-CO	D.r.	—	3 β , 7 α , 16 β 3 β , 7 β , 16 β	41 16	— —	—	[28]
7,11-(CO) ₂	D.r.	0	3 β , 7 α , 16 β	42	—	—	[28]
7,16-(CO) ₂	D.r.	0	3 β , 7 α	39	—	—	[28]
7,17-(CO) ₂	D.r.	0	3 β , 7 α , 17 β 3 β , 7 β , 17 β	32 16	3-CO, 7 β , 17 β	5	[28]
7,17-(CO) ₂	A.r.	33	5 α	6	—	—	[33]
7,17-(CO) ₂	S.r.	4	1 α , 17 β	23	12 β , 17 β 11 α , 17 β 5 α , 17 β	7 11 4	[33]
7,17-(CO) ₂	W.g.	13	2 α 2 α , 17 β	34 30	3 β 3 β , 17 β	11 5	[27]
7,17-(CO) ₂	L.f.	12	2 β	24	—	—	[37]
7,17-(CO) ₂	O.h.	38	3 β , 17 β	43	3 β	32	[27]
7,17-(CO) ₂	R.c.	38	3 β 11 α	15 18	11 α , 17 β 4 α 3 β , 17 β	8 6 5	[24]

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
7,17-(CO) ₂	R.a.	11	3 α	31	3 β 3 β , 17 β 3 α , 17 β 3 α , 11 α 3 β , 11 α 11 α	6	[24]
7,17-(CO) ₂	D.c.	0	3 α	52	1 α 17 β	4	[31]
11-CO	D.r.	10	3 β , 14 α , 16 β	12	3 β , 16-CO 3 β , 16 α	7	[28]
11-CO 11,17-(CO) ₂	O.h., W.g. A.r.	50—58 34	не выделен	— —	— 17 β	— 28	[27] [33]
11,17-(CO) ₂	S.r.	37	7 α , 17 β	27	5 α , 17 β 7 α	9	[33]
11,17-(CO) ₂	D.c.	32	7 α , 17 β	11	7 α	10	[31]
11,17-(CO) ₂	L.f.	39	не выделен	—	—	—	[37]
11,17-(CO) ₂	O.h.	63	3 α	45	17 β	44	[27]
11,17-(CO) ₂	R.a.	11	4 α , 17 β	27	7 β , 17 β	8	[24]
			3 α , 17 β	20			
11,17-(CO) ₂	R.c.	19	4 α , 17 β	54	7 β , 17 β	18	[24]
16-CO	D.r.	58	не трансфор- мируется	—	—	—	[28]
17-CO	D.r.	50	не трансфор- мируется	—	—	—	[28]
17-CO	H.p.	—	не трансфор- мируется	—	—	—	[86]
17-CO	O.h., W.g.	74—87	не трансфор- мируется	—	—	—	[27]
17-CO	C.el.	50	1 β , 7 α	14	1 β , 7-CO	6	[92]
3 α -OH, 6-CO	L.f.	0	16 β , 18	39	16 β	31	[37]
3 β -OH, 6-CO	L.f.	—	17 β	40	17-CO	3	[37]
			16 β	27	16-CO	3	
3 β -OH, 6-CO	A.r.	5	9 α	23	14 α 11 α	9	[33]
3 β -OH, 7-CO	L.f.	0	16 β	24	16 β , 18	6	[37]
3 α -OH, 7-CO	W.g.	6	17 β	55	—	—	[27]
3 β -OH, 7-CO	W.g.	4	17 β	63	3-CO, 17 β 17-CO 7 α , 17 β	3	[27]
3 β -OH, 7-CO	S.r.	0	12 α	51	9 α 12 β	19	[33]
3 β -OH, 11-CO	D.r.	0	16 β	17	15 β 14 α , 16 β 16-CO	8	[28]
3 β -OH, 11-CO	L.f.	5	16 β , 18	24	—	—	[37]
3 β -OH, 11-CO	W.g.	48	6 β	48	17 β	22	[27]
3 β -OH, 11-CO	D.r.	0	16 β	17	15 β 14 α , 16 β 16-CO	8	[28]
						5	
						3,5	

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
3 β -OH, 16-CO	L.f.	22	18	21	—	—	[37]
3 α -OH, 17-CO	R.a.	0	11 α	30	7 β	8	[24]
3 α -OH, 17-CO	P.sp.	—	12 β	12 ⁵	—	—	[3]
3 β -OH, 17-CO	P.sp.	—	7 α	11,8 ⁶	—	—	[3]
3 α -OH, 17-CO	A.t.	—	11 β	30 ⁶	11 α	5	[4]
3 α -OH, 17-CO	A.o.	—	11 α	82	—	—	[18]
3 α -OH, 17-CO	C.el.	0	7 β	43	7 α	10	[92]
3 β -OH, 17-CO	R.a.	—	7 β	57	7-CO	1	[24]
			7 α	20	6 α	8	
3 β -OH, 17-CO	W.g.	5	1 α	22	14 α	13	[27]
					9 α	7	
					5 α	7	
3 β -OH, 17-CO	F.g.	—	15 α	—	—	—	[71]
3 β -OH, 17-CO	A.t.	—	11 β	45 ⁶	—	—	[4]
3 β -OH, 17-CO	D.c.	0	9 α	40	3-CO, 9 α	15	[31]
					7 α	12	
3 β -OH, 17-CO	M.g.-c.	—	7 α	—	7 α , 14 α	—	[56]
3 β -OH, 17-CO	R.c.	7	7 β	43	6 α	25	[24]
3 β -OH, 17-CO	A.r.	4	9 α	19	9 α , 14 α	2	[33]
					7 β	12	
3 β -OH, 17-CO	S.r.	0	7 β	27	7-CO	10	[33]
			7 β , 17 β	24			
3 α -OAc, 17-CO	C.el.	15	6 β , 11 β	22	1 β	8,0	[92]
3 β -OAc, 17-CO	C.el.	0	7 β	31	7 α	3	[92]
					7-CO	3	
6 β -OH, 3-CO	L.f.	0	10 β , 18	34	—	—	[37]
6 α -OH, 17-CO	R.c.	37	11 α	56	3 β	5	[24]
6 α -OH, 17-CO	R.a.	4	11 α	72	11 α , 17 β	5	[24]
7 α -OH, 3-CO	D.r.	28	16 β	53	3 β , 16 β	28	[28]
7 β -OH, 3-CO	D.r.	33	3 β	18	—	—	[28]
7 β -OH, 11-CO	A.r., S.r.	22—63	—	—	17-CO	15—25	[33]
9 α -OH, 3-CO	D.c.	3	3 β , 16 α	47	16 α	15	[31]
9 α -OH, 3-CO	A.r.	82	не выделен				[33]
9 α -OH, 3-CO	S.r.	10	3 β , 12 α	12	—	—	[33]
11 α -OH, 3-CO	A.r.	49	не выделен				[33]
11 α -OH, 3-CO	S.r.	25	3 β , 7 β	27	7 β	17	[33]
					3 β	4	
11 α -OH, 3-CO	D.c.	28	16 α	9	—	—	[31]
12 α -OH, 3-CO	D.c.	0	3 β , 16 α	48	16 β	19	[31]
12 α -OH, 3-CO	S.r., A.r.	53—65	—	—	3 β	6—10	[33]
17 β -OH, 3-CO	A.t.	—	11 β	20 ⁶	—	—	[4]
17 β -OH, 3-CO	D.c.	54	3 β , 9 α , 17-CO	18	3 β , 9 α	9	[31]
17 β -OH, 3-CO	A.r.	5	9 α	14	7 α , 9 α , 17-CO	7	[33]
					9 α , 14 α	2	
17 β -OH, 3-CO	L.f.	67	не выделен				[37]

Таблица 2 (окончание)

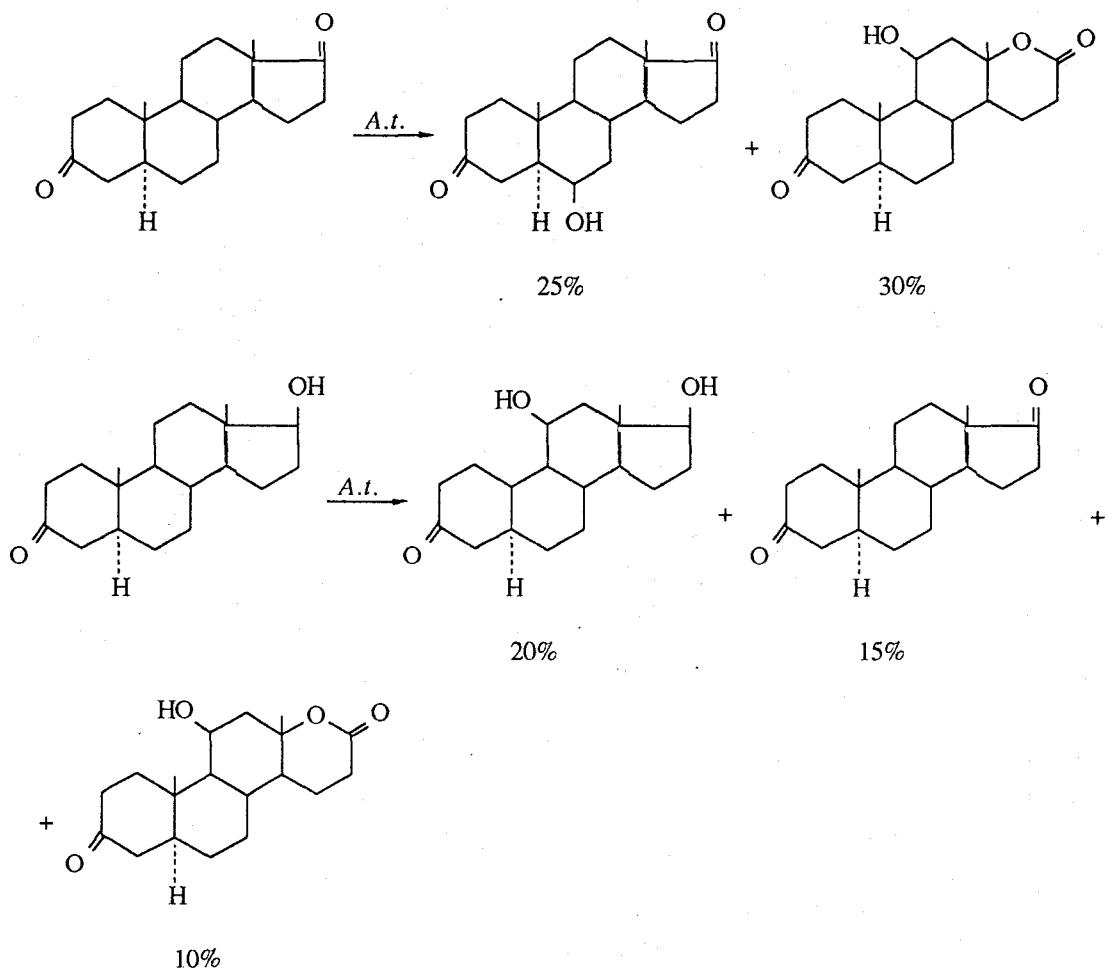
1	2	3	4	5	6	7	8
17 β -OH, 3-CO	A.o.	7	11 α	79	6 α , 11 α	2	[26]
17 β -OH, 3-CO	R.a.	21	11 α	23	3 β , 7 β	5	[24]
			6 α	12	3 β , 6 α	4	
					3 β , 11 α	4	
					5 α	4	
17 β -OH, 3-CO	D.c.	54	3 β , 9 α , 17-CO	18	9 α , 17-CO	4	[31]
			11 α		3 β , 9 α	9	
17 β -OH, 3-CO	R.c.	19	6 α	33	—	—	[24]
			11 α	26	—	—	
17 β -OH, 3-CO	R.sp.	—	1 α	—	—	—	[70]
17 β -OH, 3-CO	C.el.	—	7 α	18	9 α	0,5	[93]
					6 α	3	
					12 α	0,8	
17 β -OH, 3-CO	D.r., O.h.	81	не выделен				[27]
17 β -OH, 3-CO	W.g.	7	1 α	5	3 β	2	[27]
			1 α , 3 α , 9 α	2			
17 β -OH, 3-CO	S.r.	0	3 β , 7 α	27	7 β	9	[33]
					9 α	7	
17 β -OH, 6-CO	S.r.	19	11 α , 17-CO	23	—	—	[33]
17 β -OH, 7-CO	W.g.	14	2 α	58	3 β , 7 α	5	[27]
			2 α , 7 α	15			
			3 β	11			
17 β -OH, 7-CO	D.c.	0	3 β	26	3 α , 17-CO	16	[31]
					3 α	7	
17 β -OH, 7-CO	A.r.	18	3 β	24	3 α , 17-CO	6	[33]
17 β -OH, 7-CO	S.r.	0	3 β , 12 β	23	3 β	17	[33]
					12 β	1	
					1 β	7	
17 β -OH, 11-CO	W.g.	39	3 β	35	3 α	11	[27]
17 β -OH, 11-CO	A.r., S.r.	22—63	—	—	17-CO	15—25	[33]
17 β -OH, 11-CO	D.c.	8	7 α	18	7,17-(CO) ₂	5	[31]
3 β , 7 α -(OH) ₂ -17-CO	D.c.	70	3-CO	56	—	—	[31]
3 β , 7 β -(OH) ₂ -17-CO	A.o.	16	7 β , 11 α	78	—	—	[26]

^aВыходы здесь и в последующих таблицах приведены в расчете на конвертируемый субстрат.^bВыходы выделенного продукта в расчете на загруженный субстрат.

два, как нам кажется, важных момента. Как ни странно, но из всех изученных видов только штамм *A.t.* образует 11 β -моногидроксилированные соединения в ряду 5 α -Н-андростанов с достаточно высоким выходом. Однако для этой культуры характерна лактонизация кольца *D* и, к сожалению, этот процесс конкурирует с основной реакцией 11 β -гидроксилирования. Наличие в субстрате 3-кетогруппы активирует расщепление кольца *D* с образованием лактона, тогда как при инкубации *A.t.* с 3-

гидрокси-5 α -Н-андростаном *D*-гомоизомеризация не происходит [4] (схема 3).

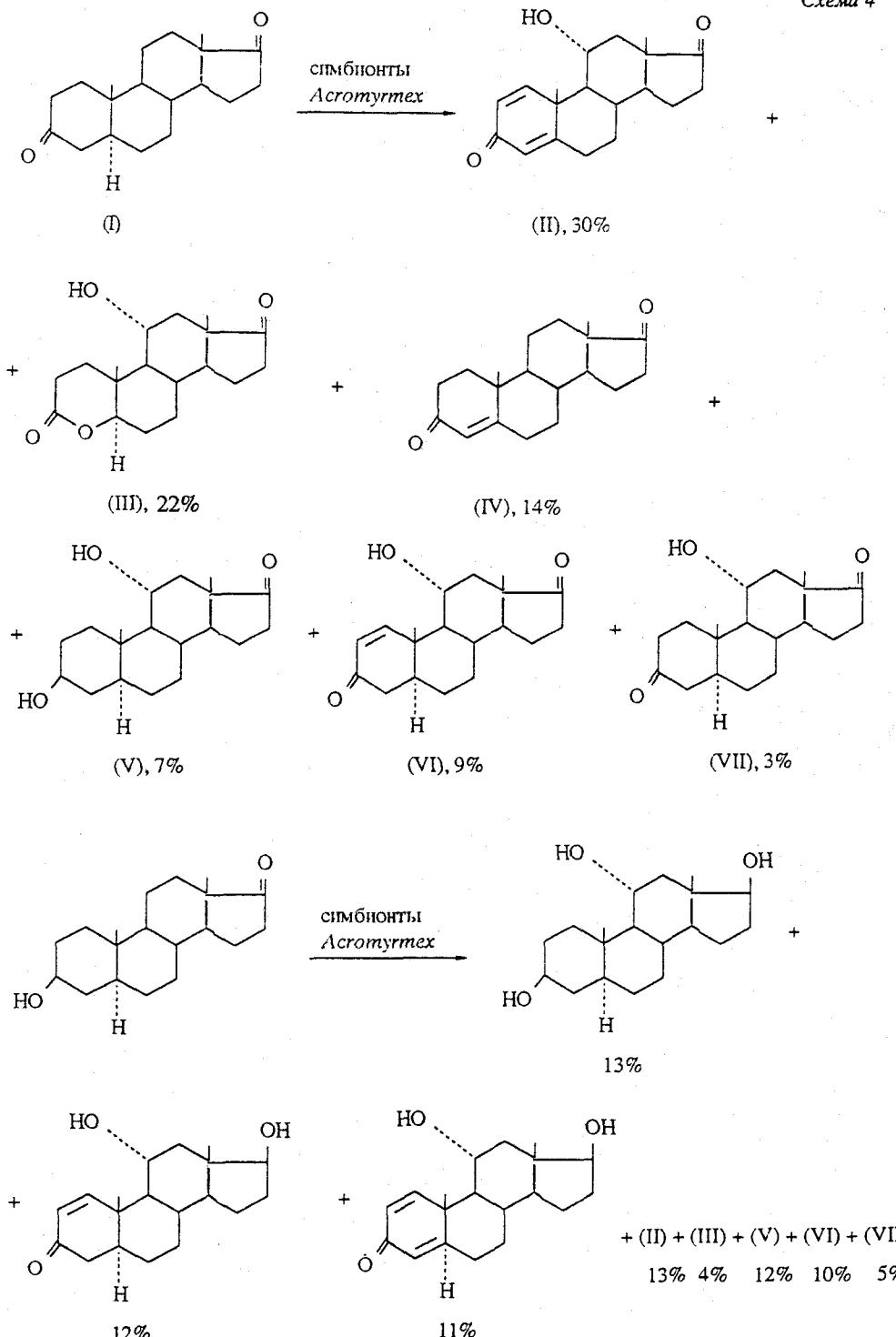
Схема 3



Второе заслуживающее внимание явление относится к неидентифицированным грибам — симбионтам муравьев, которые не исследовались ни до указанной работы [32], ни после нее. Из схемы 4 следует, что в ряду 5 α -Н-андростанов грибы-симбионты катализируют три процесса: а) гидроксилирование тех позиций, которые определены направляющим влиянием имеющихся заместителей в молекуле; б) окисление по Байеру—Виллигеру; в) дегидрирование кольца *A*. Последние два процесса протекают только при наличии кислородного заместителя в 11-положении. Примеры с 5 α -Н-андростанами, содержащими кислородные функции в положениях 3 и 17, подтверждают неизменность общего направления процесса при изменении природы кислородного заместителя при C(3) (схема 4).

Приходится сожалеть, что аналогичные исследования не проведены с соединениями ряда 5 α -Н-прегнана, поскольку одновременная активация колец *A* и *C* в pregnановом ряду представляется весьма актуальной задачей. Редкое сочетание у грибов *Acromyrmex* гидроксилирующей и дегидрирующей активностей может быть объяснено, как нам кажется, тем, что эти грибы представляют собой микробный консорциум, члены которого выполняют различные превращения стероидной молекулы. В принципе известна способность грибов рода *Septomyxa* трансформировать 5 α -Н-

Схема 4



Гидроксилированиеmono- и дикистородзамещенных 5 α -андростанов культурами *Calonetria decora* и *Rhizopus nigricans*

Таблица 3

Заместители в субстрате	Calonetria decora [13, 19, 20, 30]					Rhizopus nigricans [14, 22, 23]				
	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a
1-CO	75	Сложная смесь	—	—	—	51	6 α , 16 α	10	6 α , 16 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH)	2,5
2-CO	13	6 α , 12 β	26	6 α , 11 α	11	46	11 α , 16 β	18	6 β , 11 α	4
3-CO(EtOH)	23	12 β , 15 α	40—52	12 β , 15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	13	—	11 α , 16 β	33	6 β , 11 α	4
3-CO(DMCO)	0	6 α , 12 β , 15 α	28		—	—	11 α , 16 β	11 α		1
3 β -OH(EtOH)	33	12 β , 15 α	18	—	—	40	11 α , 16 β	9	11 α , 16 β (4-CO \rightarrow 4 β -OH)	7
4-CO	0	12 β , 15 α	41	—	—	—	11 α , 16 β	9	11 α , 16 β (4-CO \rightarrow 4 β -OH)	7
		11 α , 15 α	40	—	—					
6-CO	90	Не реагирует				90	Не реагирует			
7-CO	72	»		12 β , 15 α	4	90	3 α , 16 β	34	4 β , 16 β	16
11-CO	40	1 β , 6 α	11	6 α	3	62	4 α , 16 β	7	3 α , 16 β	5
									3 β , 16 β	3
15-CO	4	14 β , 6 α , 12 β	21	2 α , 12 β	8	59	Не выделено			
16-CO	31	6 α , 11 α	26—33	1 β , 6 α	7	34	3 β , 7 α	46		
17-CO	32—75	1 β , 6 α	15—47	1-CO, 6 α , 19	38	59	3 α , 11 α	10	3 α , 6 α	8
12-CO	8	6 α , 15 α	15	1 β , 6 α , 15 α	12	—	3 β , 7 β	9	3 β , 11 β	2,5
							6 α , 11 α	9		
							3 β , 7 β	29		
17 β -OH	41	1 β , 6 β	18	6 α , 11 α	7					
15 α -OH-2-CO	0	6 α	13	—	—					
17 β -OH-2-CO	4	6 α	31	—	—	17	6 α	15	—	7
6 α -OH-3-CO	—	—	—	—	—	0	16 α	30	17 α	4
6 β -OH-3-CO							16 β	27	11 α , 16 β	
							11 α	14		
						0	16 β	39	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	2

7 α -OH-3-CO					11 α , 16 β	30		
				0	11 α	14		
					16 β	33		
					16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	24		
7 β -OH-3-CO				31	16 β	52		
11 α -OH-3-CO	4	12 β , 15 α	24	-	5	16 β	45-30	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)
						14	7 β , 17 α , 16-CO	11
						11-50		4
11 β -OH-3-CO				27	9 α , 16 β (11 β -OH \rightarrow 11-CO)	13	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4
					16 β	11	6 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH), 11 β -OH \rightarrow 11-CO	2
					16 β (11 β -OH \rightarrow 11-CO)	9	16 α -(3-CO \rightarrow 3 β -OH), 11 β -OH \rightarrow 11-CO)	1
					16 β -(3-CO \rightarrow 3 β -OH, 11 β -OH \rightarrow 11-CO)	9		
16 β -OH-3-CO				0	11 α	61-80	11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	23-27
17 β -OH-3-CO				8	11 α	34	7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	7
					6 α	30	5 α	6
17 β -OMe-3-CO	16	12 β , 15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	8	-	-	-	-	
3 β -OH-6-CO				0	16 α	43	16 β	18
17 β -OH-6-CO				0	3 β	23	5 α , 11 α	7
					3 α	21	3 α , 11 α	7
3 β -OH-7-CO				0	11 α	11		
17 β -OH-7-CO				0	16 β	77		
				0	3 α	52	4 α	3
							3 β	12

Заместители в субстрате	Cakiletria decira [13, 19, 20, 30]					Rhizopus nigricans [14, 22, 23]				
	Возвра-щенный субст-рат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Вых од, %	Возвра-щенный субст-рат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a
3 β -OH-11-CO					0	16 β	34	7 β , 16 β		8
					16 α	11	17 β , 16-CO			7
					6 α	9	16-CO			6
							5 α , 16 β			5
							7 β , 17 α			4
17 β -OH-11-CO					26	3 α	47	-		-
15 α -OH-12-CO	0	6 α	13	-	-	4 α	25	-		-
14 β -OH-15-CO	23	7 β , 12 β	34	7 β , 12 β	-					
12 β , 14 β (OH) _{2-15-CO}	0	7 β	21							
3 β -OH-16-CO					0	7 α	90	-		-
3 α -OH-17-CO		1 β , 15 α	25	-	-	7	7 β	24		
		1 β , 6 α	37	-	-	-	11 α	23	6 α	5
3 α -OMe-17-CO	3	1 β , 6 α	60	-	-					
3 β -OH-17-CO	6	12 β , 15 α (3 β -OH \rightarrow 3-CO)	32		0	7 β	48	7 α		15
		12 β , 15 α	21							12
6 α -OH-17-CO					16	11 α	58	3 β		10
7 α -OH-17-CO					10	3 β	77			
17 β -OH-17-CO					25	3 β	57			
2,16-(CO) ₂	-	12 β -6-CO	27	6 α , 12 β	12	0	7 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH)	55	7 α	7
								6 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH)		5
1,17-(CO) ₂	15	6 α	33	6 α , 19	25					
2,17-(CO) ₂	15	6 α	13		0	7 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH)	20	7 β (2-CO \rightarrow 2 α -OH)		6

3,6-CO) ₂					6	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 16 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 16 α	26 23 23	6 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH) 16 β	2 9
3,7-(CO) ₂	26	12 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 15 α	19 23 18		4	16 β	32	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	9
3,11-(CO) ₂	27				4—19	16 β	55—20	9 α , 16 β	6
						16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	20	9 α , 16 α	5
								16 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4
								16 α	2
3,12-(CO) ₂	10	15 α	14						
3,16-(CO) ₂	69	15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	26	12 β , 15 α	11	0	7 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	50	—
3,17-(CO) ₂	23	12 β , 15 α	5			32	11 α 6 α	23 15	6 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)
6,17-(CO) ₂	27	1 β	64—56			—	0	3 α 3 β	37 7
7,17-(CO) ₂	25	1 β	55	—		—	0	3 α , 11 α 3 β (17-CO \rightarrow 17 β -OH)	5 4
								3 α -(17-CO \rightarrow 17 β -OH)	6
11,16-(CO) ₂ (EtOH, 6 α)						22	3 β , 7 β 3 α	24 10	3 β
11,17-(CO) ₂	4	6 α	32	—		—	21	3 α (17-CO \rightarrow 17 β -OH)	36
1,17-(CO) ₂ -6 α -OH	6—40	19	26—29	—		—		4 α (17-CO \rightarrow 17 β -OH)	15
3 β , 6 α -(OH) ₂						6	16 α	3 α	14
3 β , 6 β -(OH) ₂						17	16 β	16 β	17
							38	15 α	17

стериоиды в $\Delta^{1,4}$ -3-кетосоединения, но при этом они не проводят гидроксилирование [72—74].

Значительный прогресс в понимании механизма гидроксилирования стериоидов достигнут благодаря работам ученых Оксфордского университета. Они исследовали влияние функциональных групп субстрата на тип гидроксилирования разными грибными культурами. В попытке отойти от единобразия, возникшего при использовании субстратов прогнанового ряда с кислородсодержащими заместителями при C(3) (в основном CO), и найти общую модель гидроксилирования научная группа под руководством Джонса исследовала очень широкий набор 5 α -Н-стериоидов (более 300), в котором систематически менялись положения, природа кислородсодержащих заместителей и их количество, а также были первоначально исключены дополнительные структурные факторы (двойная связь, сочленение колец, наличие гетероатома). Эта гигантская работа, в ходе которой было получено более 800 гидрокстериоидов, и значение которой трудно переоценить, выполнена в 1969—1980 гг. [13—38]. Сначала в орбиту исследований вовлекались известные микроорганизмы, характеризующиеся как субстрат-специфичностью, так и субстрат-независимостью, затем новые микроорганизмы, не изученные ранее в качестве стериоид-гидроксилирующих биокатализаторов, сплоть до вышеуказанных грибов — симбионтов *Ascomyces octospinosus* [32].

Данные табл. 2 и 3 показывают, что эти исследования пришли на смену эпизодическим и немногочисленным исследованиям трансформаций 3,17-дизамещенных 5 α -Н-андростанов отдельными культурами [54—56, 64, 70, 77]. Ученые Оксфордского университета изучили влияние широкого набора заместителей в 5 α -Н-андростане на гидроксилирующую способность A.g., P.u., R.a., R.c., W.g., O.h. с акцентом на C.d., R.p., A.o. Полученные результаты в большинстве случаев подтверждают гипотезу Браннона [4], согласно которой гидроксилирование в различные положения стериоидной молекулы катализируется одним неспецифичным ферментом. Этой гипотезе не противоречит и построенная на основании интерпретации результатов гидроксилирования различных субстратов R.p. [22, 23] модель фермент-субстратного взаимодействия, определяющая направление гидроксилирования. Общая интерпретация механизма гидроксилирования, предложенная Джонсом [78], не только удовлетворительно объяснила результаты окисления стериоидов вышеупомянутыми культурами, но и получила признание и развитие в работах других групп исследователей [79—96].

Предложенная модель гидроксилирования предлагает существование на поверхности ферментной глобулы трех активных центров, служащих двум целям, т.е. каждый центр-сайт может выполнять две функции — функцию связывания фермента с субстратом и функцию гидроксилирования (рис. 1). Согласно этой модели, сайты

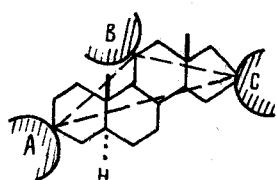
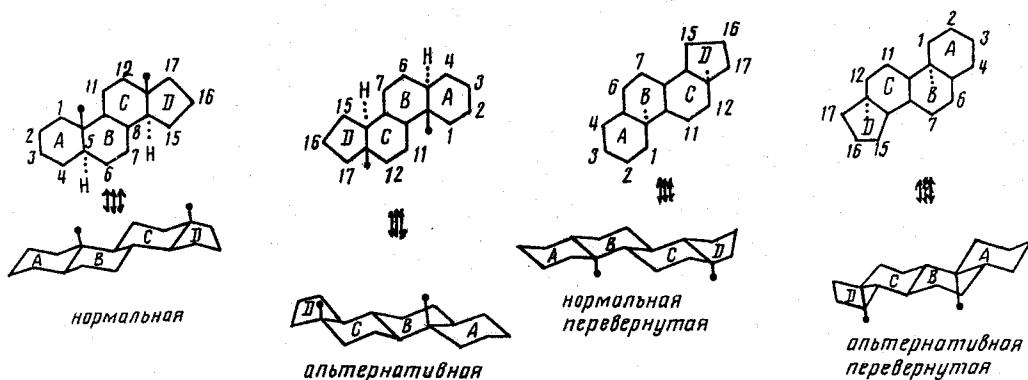


Рис. 1. Модель фермент-субстратного взаимодействия по Джонсу [78]

имеют триангулярную локализацию, приблизительно соответствующую той, которую занимают атомы C(3), C(11) и C(17) стериоидного кольца. Способ образования фермент-субстратного комплекса и, следовательно, результат гидроксилирования будет зависеть от того, несут ли эти центры стериоидного кольца кислородные заместители (сколько и какие); при этом связывание стериоида с ферментом может происходить в одной из возможных ориентаций. Считается, что теоретически возможны четыре ориентации стериоида по отношению к ферменту: а) нормальная (normal), б) альтернативная (reverse), в) нормальная перевернутая (normal capsized), г) альтернативная перевернутая (reverse capsized), две последние получаются вращением стериоидной

молекулы вокруг оси С(3)—С(17) на 180° . Нормальная и альтернативная ориентации — более предпочтительны и практически только они рассматриваются в модели гидроксилирования Джонса (схема 5).

Схема 5



Согласно этой модели связывание фермента со стероидным субстратом происходит по двум кислородным центрам, что хорошо подтверждается данными трансформации монокетонов 5α -Н-андростанов различными культурами. Практически все монокетоны (1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 11-, 12-, 15-, 16-, 17-СО) трансформируются или с большим трудом — с возвратом до 90% непрореагировавшего субстрата — или не трансформируются совсем. При наличии трансформации наблюдается большая неоднородность продуктов реакции. Высокий процент возврата может быть связан с низкой растворимостью монокетонов по сравнению с другими стероидами и, следовательно, с более трудным проникновением в клетку. Но основное объяснение низкой реакционноспособности монокетонов и неоднородности получаемых из них продуктов заключается, по-видимому, в том, что молекула субстрата, закрепленная на поверхности фермента только на одном сайте, вращается или раскачивается вокруг центра связывания, подвергая каталитическому действию фермента не всегда предсказуемые положения. При этом монокетоны, как правило, подвергаются дигидроксилированию. Как это происходит у *D.r.*, показывает рис. 2.

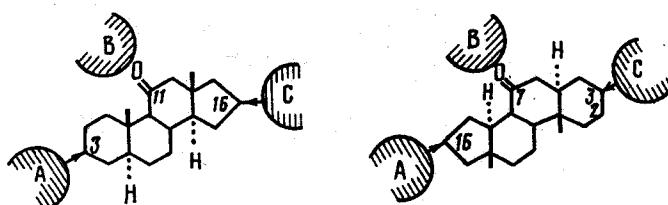


Рис. 2. Направление гидроксилирования 11-кето- и 7-кето- 5α -Н-андростанов культурой *D.r.* [28]

Эта же модель объясняет принцип дигидроксилирования монокетонов грибами *C.d.* и *R.p.* следующим образом: кетогруппа субстрата в одной (или нескольких) из его ориентаций связывается с одним из связующих центров фермента, а два других сайта выполняют функцию гидроксилирования тех С—Н-связей, которые оказываются расположенными к ним вицинально. Например, 3- и 16-кетоны дигидроксилируются *R.p.* в 11,16- и 3,7-положения вследствие связывания кетогрупп с ферментом в центре А нормальным и альтернативным способами соответственно (рис. 3). Образование многокомпонентной смеси 6,11-, 3,7- и 3,11-дигидроксипроизводных при трансформации 17-кето- 5α -Н-андростана авторы объясняют неоднородным связыванием обоими

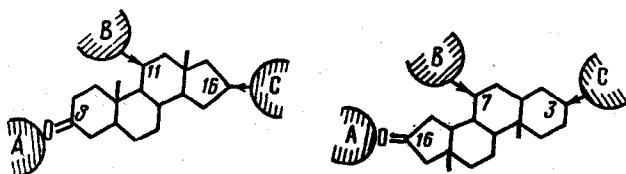
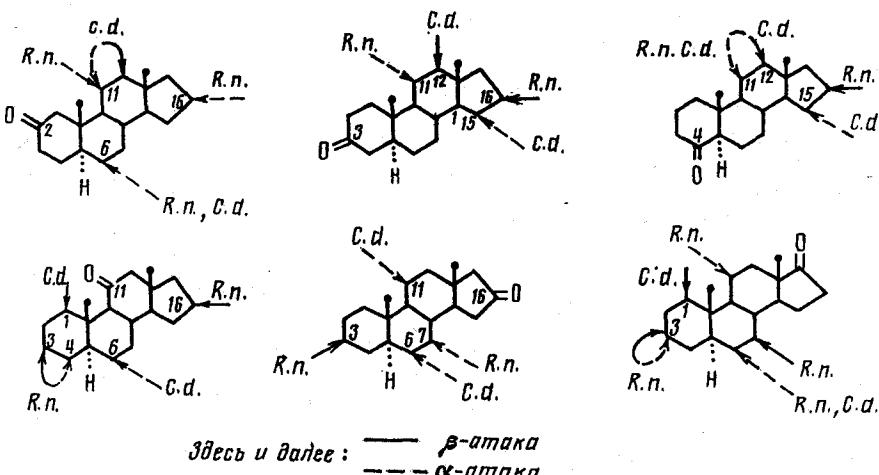


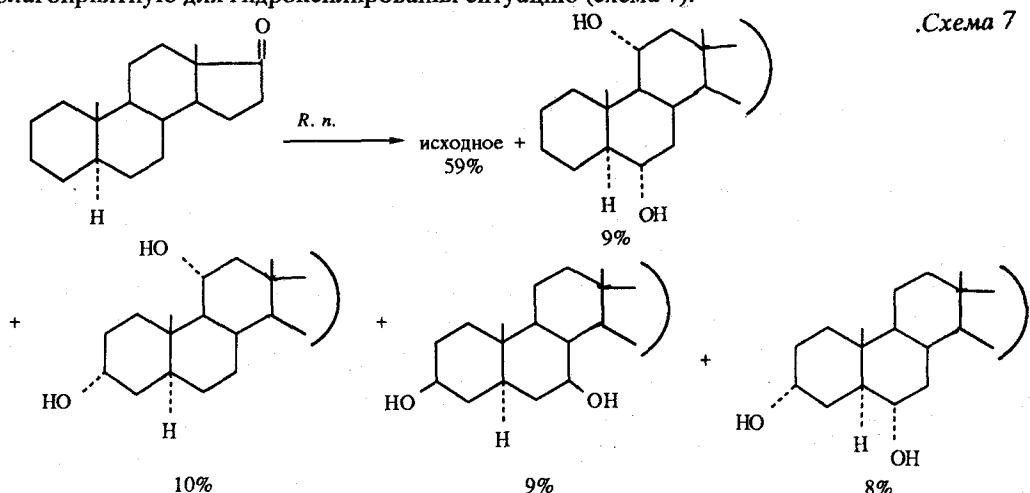
Рис. 3. Направление гидроксилирования 3-кето- и 16-кето-5 α -H-андростанов грибами C.d. и R.n. [20, 22, 30]

способами. В этом случае плохо поддается объяснению образование 6,11-дигидроксипроизводных, а также образование 6 α -, 16 α - и 6 α , 11 α -, а не 11,16-дигидроксизамещенных продуктов при трансформации 2-кето-5 α -H-агдростана с помощью R.n. [22].

Схема 6



Не исключено, что указанные варианты дигидроксилирования являются следствием последовательного моногидроксилирования сначала в 11 α - или 16 α -положения, а затем в 6 α -; во всяком случае известно об индукции 6-гидроксилазы у R.n. 11 α -гидроксистероидами при инкубации с Δ^4 -3-кетостероидами [2]. Возможно, что 16 α -гидроксипроизводные 5 α -H-стериолов также индуцируют синтез второго фрагмента. Следует заметить, что высокий процент возвращенного исходного субстрата (17-СО и 2-СО) указывает на то, что ни один из доступных способов связывания не создает благоприятную для гидроксилирования ситуацию (схема 7).



Рассмотрим эти данные (схема 6) в сравнении с результатами окисления монокетонов 5α -Н-андростанов культурой *C.d.* Как правило, *C.d.* вводит обе экваториальные группы на расстояние, практически одинаковое от кислородного атома субстрата, причем расстояние между атакуемыми углеродными атомами примерно тоже одинаково ($1 - 6 = 3,9 \text{ \AA}$; $6 - 11 = 4,4 \text{ \AA}$; $11 - 15 = 4,5 \text{ \AA}$). Как видно, окисление монокетонов *R.n.* не столь специфично, ибо наряду с экваториальным имеет место и аксиальный способ замещения, а расстояние между атакуемыми центрами не столь однообразно, хотя и составляет в большинстве случаев $\sim 5\text{\AA}$ ($11 - 16$, $3 - 17$). Заметная конверсия монокетонов в главный продукт при инкубации с *C.d.* осуществляется только тогда, когда заместитель находится в терминальных кольцах. Интересной особенностью *R.n.* по отношению к стероидам ряда 5α -Н-андростана является интенсивное гидроксилирование в 16β -положении (см. выше табл. 3), никогда не проявляющееся в pregnановом ряду [35]. Низкой способностью к окислению моноспиртов *R.n.* также отличается ($1-\alpha$, $3-\beta$, $6-\alpha$, $11-\alpha$, 17β), при инкубации с которыми остается 75—95% исходного субстрата [22], тогда как *C.d.* гидроксилирует по крайней мере 3β - и 17β -спирты (остальные не исследованы) (табл. 3). Наиболее характерным для *C.d.*-вида, известного как 12β , 15α -дигидроксилирующая культура для Δ^4 -3-кетостероидов [104], является также 12β , 15α -дигидроксилирование 5α -Н-андростанов с $3-\text{CO}$, $3\beta-\text{OH}$, $3\alpha-\text{OH}$ заместителями, а также соединений с $3\beta-\text{OH}-\Delta^1$, $3-\text{CO}-\Delta^1$ или 17 -ацетатной группировками [13, 19, 29]. В отличие от *C.d.* плесени *R.n.* и *A.o.* не гидроксилируют 3 - и 17 -моноацетаты 5α -Н-андростана [29].

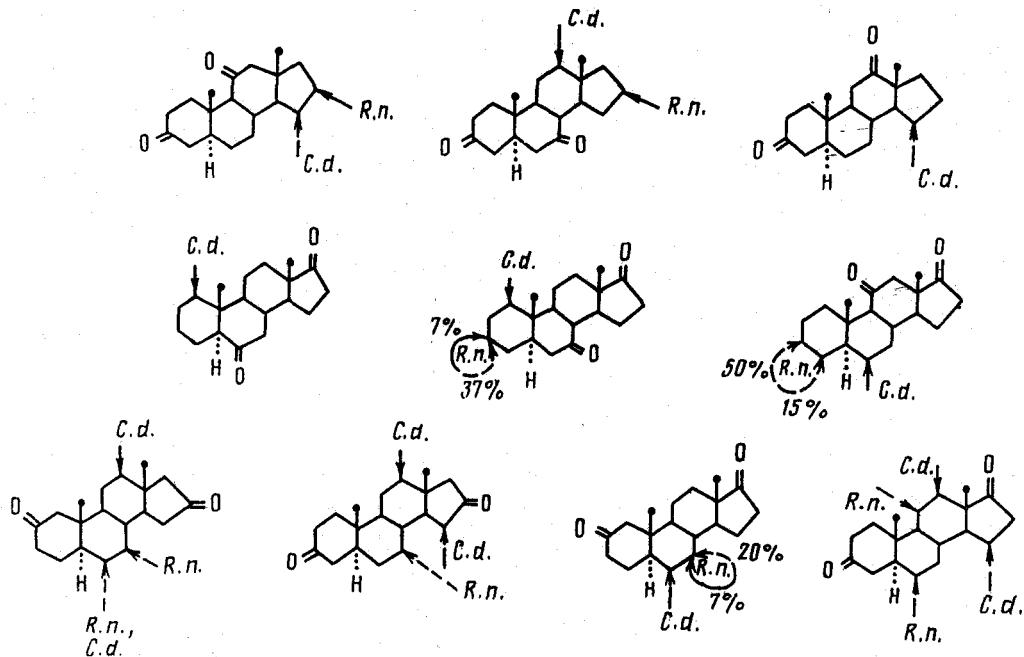
При трансформации монокетонов с помощью *D.r.* связывание фермента с субстратом происходит в основном с участием заместителя в центре молекулы (*C(7)* или *C(11)*) с образованием 3β , 16β -дигидроксилированных продуктов (табл. 2, рис. 2). При использовании в качестве субстратов андростанов с заместителями в терминальных кольцах (3 -, 16 -, 17 -) возврат непрореагировавшего стероида составляет 50—90%, образуется сложная смесь неидентифицированных продуктов [28]. Культуры *W.g.*, *O.h.*, *D.c.*, *D.r.* и *S.r.* инертны по отношению к большинству моно- (в основном CO) замещенным 5α -Н-андростанов [27], что согласуется с обсуждаемой гипотезой о вероятном участии в связывании двух центров фермента.

Культура *A.o.* также не трансформирует большинство монокетонов. Исключение составляют 3 - и 17 -кетоандростаны, превращаемые с 44 и 35%-ной конверсией соответственно в 6β , 11α -дигидрокси- и 7β , 11α -дигидроксипроизводные (51 и 27%) и 11α -дигидроксипроизводные (11 и 5%) [21]. Однако образование дигидроксилированных производных культурой *A.o.* обусловлено действием не одного фермента, как у *C.d.*, а двух стероид-гидроксилаз, существование которых показано в экспериментах с бесклеточным экстрактом [75, 76]. Предполагается, что вторая гидроксилазная система в клетках *A.o.* индуцируется продуктом реакции первого фермента, которым всегда является 11α -гидроксипроизводное, что приводит к образованию 6β , 11α -дигидроксипроизводных, но никогда — 6β -моногидроксипроизводных [28]. Присутствие в молекуле второй кислородсодержащей группы (CO или OH) в различных положениях облегчает гидроксилирование 5α -Н-андростанов с помощью *A.o.*, но всегда в 11α -положение. Кроме того, если при инкубации с монокетонами *A.o.* катализирует преимущественно дигидроксилирование, то дизамещенные андростаны превращаются этой культурой с высоким выходом 66—82% исключительно в 11α -моногидроксипроизводные (табл. 2). Однако функционирование в клетках *A.o.* двух стероид-гидроксилаз и характерная для этого микроорганизма сайт-специфичность дают основание считать его неподходящим для решения поставленной задачи. В связи с этим основное внимание группы было сосредоточено на *C.d.* и *R.n.*, которые способны к гидроксилированию стероидов в различные положения в зависимости от структуры субстрата (табл. 3), с привлечением культур, указанных в табл. 2.

Анализ результатов превращения монозамещенных 5α -Н-андростанов показывает, что движущей силой, которая определяет направление гидроксилирования, является

специфичность микроорганизма и ориентирующее действие кетогруппы. Использование в качестве субстратов различным образом замещенных кетонов и дикетонов позволяет, увеличив скорость и эффективность трансформации (изменением гидрофильности субстрата, растворителя для внесения в реакционную смесь, времени инкубации), проследить за конкурентным влиянием заместителей, ограничив процесс моногидроксилированием за счет блокирующего действия второго заместителя и, главное, выявить факторы, ответственные за направление гидроксилирования. Замечено, что полярные группы в терминальных кольцах так же, как это наблюдалось на монозамещенных андростанах, оказывают доминирующее влияние на процесс гидроксилирования культурой *C.d.* Например, общая для субстрата 3-кетогруппа в 3,11-, 3,12- и 3,7-дикетонах направляет гидроксилирование в кольца *C* и *D*, а общая для субстрата 17-кетогруппа в 6,17-, 7,17-, 11,17-дикетонах направляет гидроксилирование этим микроорганизмом в кольца *A* и *B*. При этом кетогруппы в средних кольцах *B* и *C* обладают слабым ориентирующим эффектом, блокируя гидроксилирование в собственное положение и стимулируя в соседние или пространственно сближенные (табл. 3, схема 8).

Схема 8



Естественно, что конкуренция кетогрупп, расположенных в терминальных кольцах (4 последних примера на схеме 8) выражается в дигидроксилировании, направление которого обусловлено ориентирующим влиянием обеих кетогрупп. Гидроксильные группы в образующихся главных продуктах, как правило, экваториально ориентированы и находятся на расстоянии 3,5—4,5 Å от ближайшего кислороднесущего углерода и на расстоянии 6,3—8 Å либо от C(3) (субстрат с заместителем в кольце *A*), либо от C(17) (субстрат, замещенный в кольце *D*). Направляющая сила основных ориентирующих заместителей при анализе результатов окисления оценена следующим образом: 3-CO- Δ^4 (и менее четко 5 α - и 3 β -OR, R = H, Me) > 17-CO > 3 α -OR (R = H; Me); 3-CO, Δ^4 > 17 β -OH и т.д., т.е. природа кислородной функции менее важна, чем ее пространственная ориентация относительно стероидного ядра в целом. Это чрезвычайно важный вывод, позволяющий разрушить укоренившееся и, как уже показано на культуре *A.o.*, по-видимому ложное представление о необходимости, например, Δ^4 -3-кетогруппы в молекуле стероида для успешного их микробиологического гидроксилирования.

Согласно обсуждаемой модели гидроксилирования, дикислородсодержащие субстраты ориентируются у молекулы фермента таким образом, чтобы обеспечить максимально возможное гидрофильное связывание между обоими заместителями и соответствующими им центрами фермента, в таком случае третий каталитический центр отвечает за гидроксилирование ближайшего атома углерода.

Ферменты *R.l.* гидроксилируют терминально замещенные субстраты, ориентированные нормальным способом, в положение 11, а ориентированные альтернативным способом — в положение 6 или 7. Так, из четырех подвергнутых окислению терминально замещенных дикетонов три субстрата (2,16-, 2,17-, 3,16-) гидроксилируются только альтернативным способом (табл. 3, схема 8) [23]. Приведенные модели показывают, что для первых двух стероидов связывание нормальным способом не дает возможности для контакта стероида с ферментными сайтом В, а в 3,16-дикетоне геометрическое расположение центров благоприятно для обоих видов связывания. Наблюдаемый для 3,16-дикетона альтернативный способ гидроксилирования свидетельствует о предпочтительности связывания 16-кетогруппы по сайту А. 3,17-Дикетон, хотя и гидроксилируется нормальным способом, но с низкой конверсией (32% исходного), низким выходом 11α -оксипроизводного (23%) и образованием 6α -оксипроизводного. Поэтому будет справедливым сказанное выше для 17-монокетона распространить на 3,17-дикетон. Поразительным результатом является количественное 11α -гидроксилирование (~ 100%) 16β -гидрокси-3-кетона и 7α -гидроксилирование (90%) 3β -гидрокси-16-кетона, если вспомнить, что соответствующие моноспирты не трансформируются *R.l.* [23]. Вероятно, эти спирты в сочетании с 3-кето- и 16-кетогруппами дают оптимальную модель для гидроксилирования соответственно нормальным и альтернативным способами. 17-Кетогруппа в сочетании с 3β -гидроксильной проявляют заметное предпочтение гидроксилирования одним (альтернативным) способом (48% 7β -ОН и 15% 7α -ОН), наличие же 3α -гидроксильной группы способствует образованию продуктов гидроксилирования обоими способами (23% 11α -ОН и 5% 6α -ОН). Присутствие 17β -гидроксильной группы в 17β -гидрокси-5- α -андростан-3-оне, хотя и облегчает процесс гидроксилирования *R.l.*, но делает его селективным. Вероятно, и здесь асимметричное расположение заместителя при С(17) мешает оптимальному способу связывания субстрата с ферментом.

Результаты окисления *R.l.* практически всех изученных кетонов и кетолов с одним кислородным атомом в терминальном кольце, а другим — в среднем удовлетворительно интерпретируются с позиций представления о трех двухцелевых сайтах. Как правило, субстраты с заместителем в кольце А гидроксилируются преимущественно в кольцо D и наоборот, замещенный в кольце D субстрат гидроксилируется в кольцо А, т.е. и здесь, как и в случае с *C.d.*, наблюдается доминантное влияние терминальных заместителей, связывающихся с ферментом по сайту А чаще нормальным или альтернативным способом и гидроксилирующимся по сайту С. Заместители же в центральных кольцах оказывают лишь вспомогательное, обсужденное выше для *C.d.* влияние (схема 9). Минорные продукты гидроксилирования, вероятно, могут возникнуть при внедрении гидроксильной группы в соседние с основным направлением гидроксилирования положения (например, 4 или 17). Нельзя не отметить, что для дизамещенных соединений более характерно моногидроксилирование, даже если способ связывания молекулы с субстратом благоприятен для вхождения второй группы. Так, в приведенных выше на схеме 10 примерах эпимерные 7-гидрокси-3-кетоны вовсе не гидроксилируются по сайту В, а эпимерные 6-гидрокси-3-кетоны — лишь частично (см. табл. 3).

В авторском варианте предлагаемая модель гидроксилирования акцентирует внимание на регионарности реакций, но совершенно игнорирует их стереохимические аспекты: стереоспецифичность реакций или ее отсутствие, влияние стереохимии заместителя в субстрате. Спустя два года Криндл с соавт. [79], анализируя гидроксилирование норкаранов *R.l.* с позиций гипотезы Джонса о формировании временного ферментсубстратного комплекса предложили ее модификацию, которая

Схема 9

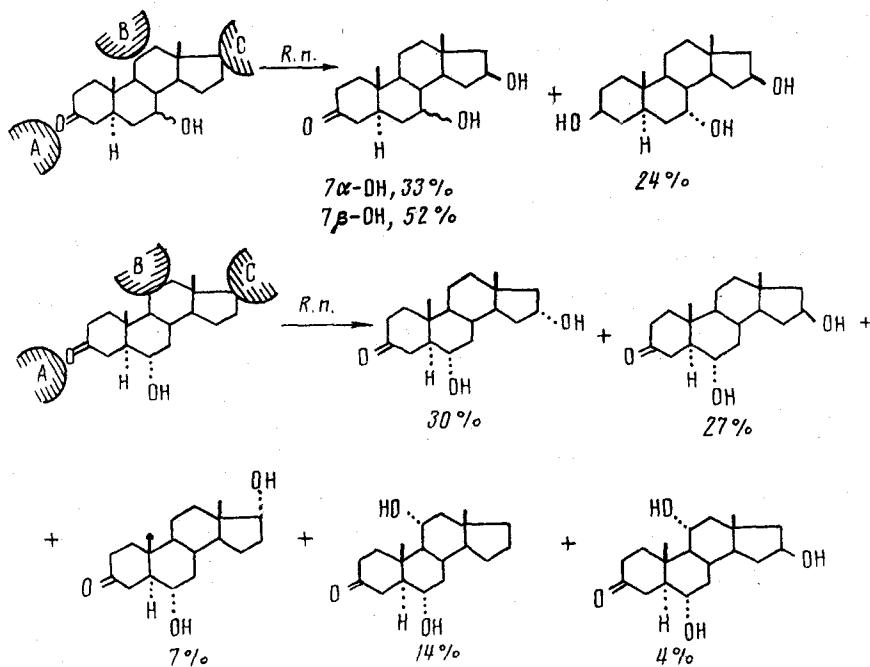
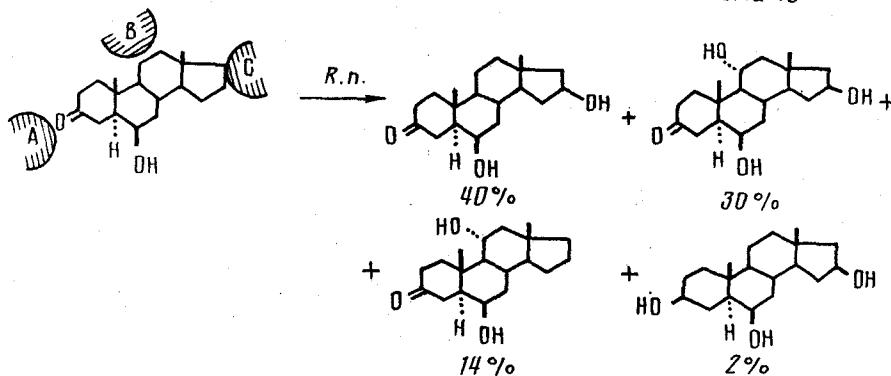


Схема 10



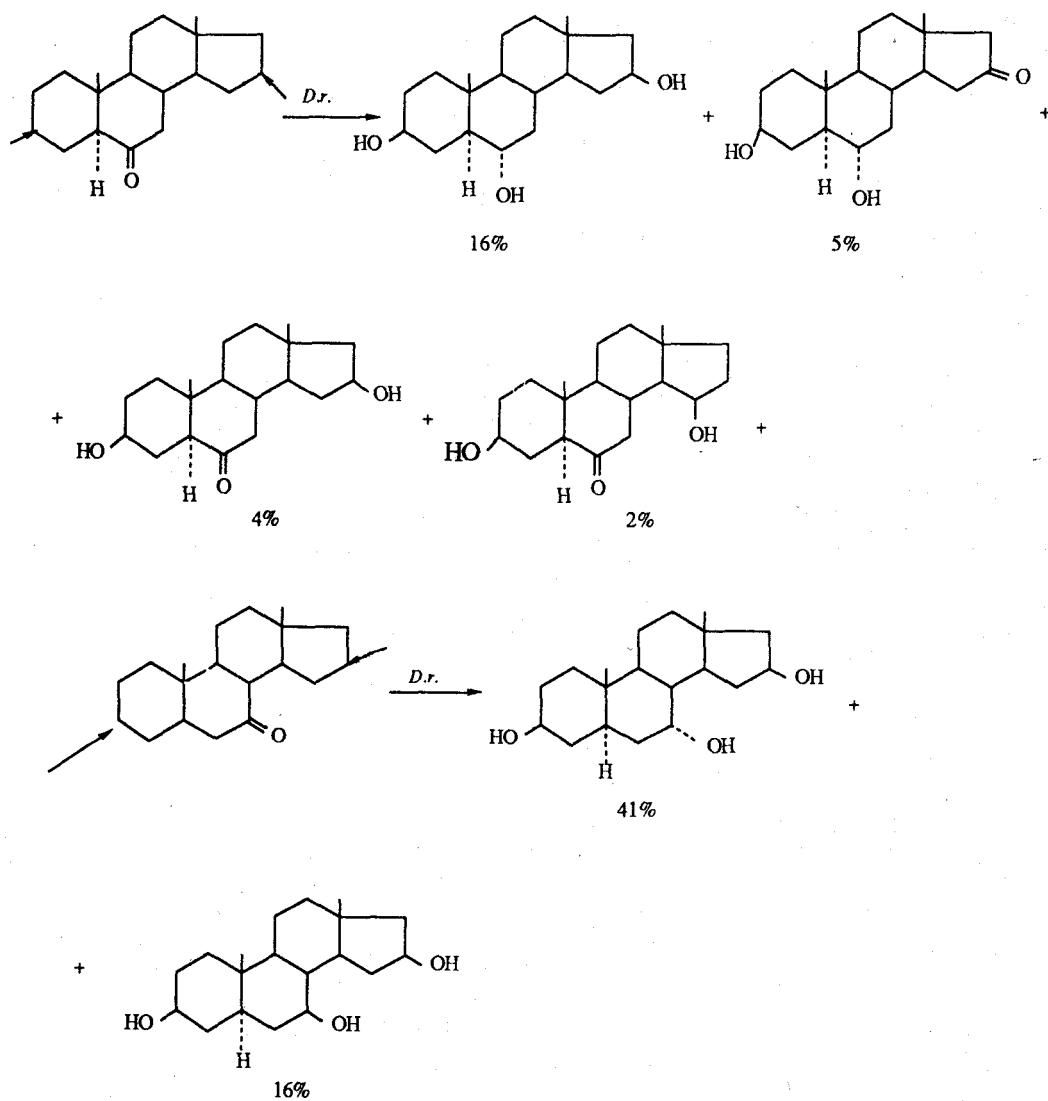
учитывает трехмерность стероидной молекулы и белковой глобулы. Их идея заключалась в том, чтобы провести воображаемую плоскость через молекулу стероидного субстрата таким образом, чтобы сайты А и В были бы ниже ее (или копланарны), а центр С — выше. При этом предполагается, что центр А предпочитает связывать кислородные атомы ниже этой плоскости и гидроксилирование происходит в α -области. Центр В предъявляет аналогичные требования к связыванию с ферментом, но гидроксилирование может происходить как в α - (аксиальной или экваториальной), так и в β -области (только экваториальной). Центр С предпочтует связываться с ферментом выше этой плоскости и направлять гидроксилирование в β -положение. С точки зрения авторов все результаты по стереохимии гидроксилирования стероидов R.n. и собственные данные по гидроксилированию норкаранов хорошо укладываются в рамки этой гипотезы [79].

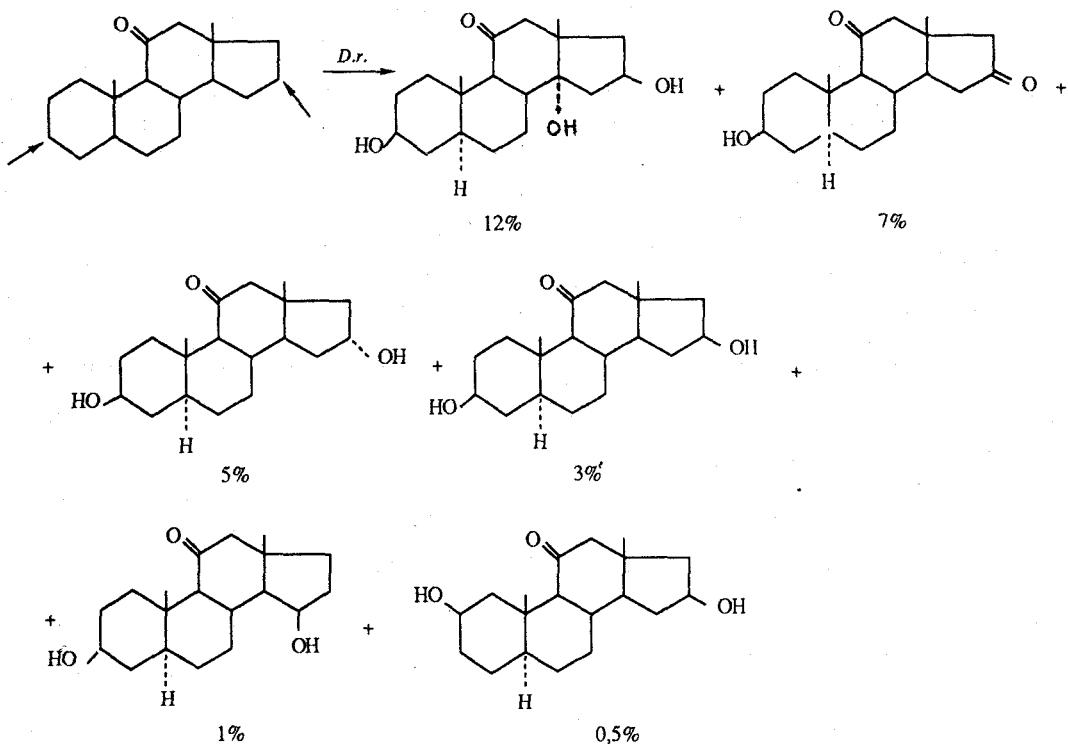
В предложенную гипотезу хорошо вписываются результаты трансформации 5 α -андростанов культурами *W.g.*, *O.h.* и *D.r.*, где большинство моно- (в основном СО)

замещенных 5α -андростанов инертны в присутствии *W.g.* и *O.h.* Ферментная система *D.r.* проявляет удивительный контраст между медленным гидроксилированием субстратов с карбонильной группой в терминальном кольце и более высокой скоростью превращения субстратов с этой группой в центральном кольце. Так, 5α -андростаны с 3-CO, 16-CO и 17-CO-группами трансформируются *D.r.* лишь на 10—40%, образуя сложную смесь неидентифицированных продуктов, а их 6-CO, 7-CO, 11-CO-аналоги окисляются с 80—90%-ной конверсией по терминальным кольцам. Процессы гидроксилирования 11- и 7-кетонов культурой *D.r.* отличаются специфичностью: первые дают несколько продуктов гидроксилирования, тогда как 7-кетоны гидроксилируются более однозначно (схема 11, табл. 2).

Рассмотрим на примере этих культур (*W.g.*, *D.r.*, *O.h.*), как полученные с их помощью результаты указываются в рамках модели Джонса. Ферментная система *O.h.* оказалась инертной по отношению к терминально-замещенным дикислородсодержащим андростанам. Культуры *W.g.* и *D.r.*, напротив, эффективно гидроксилируют эти

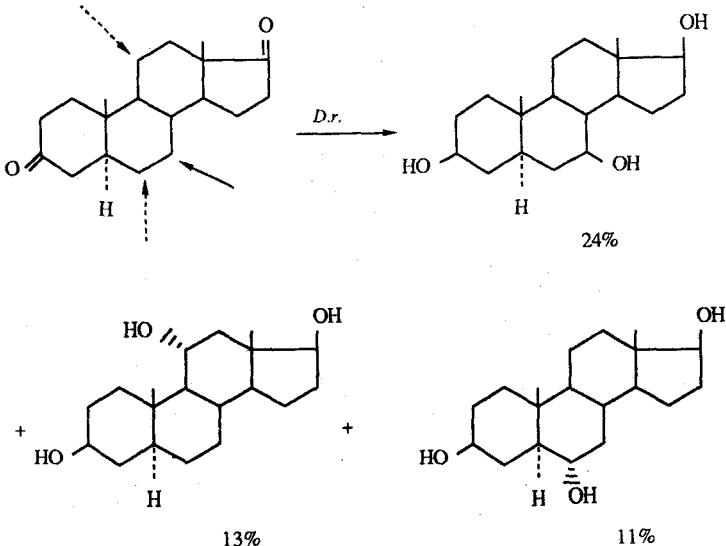
Схема 11

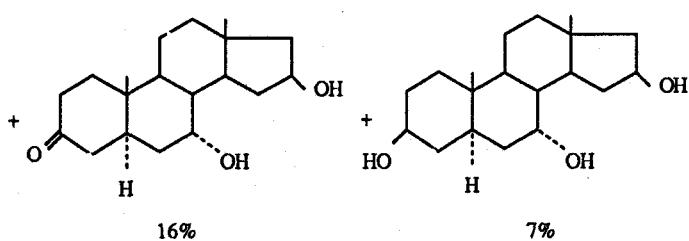
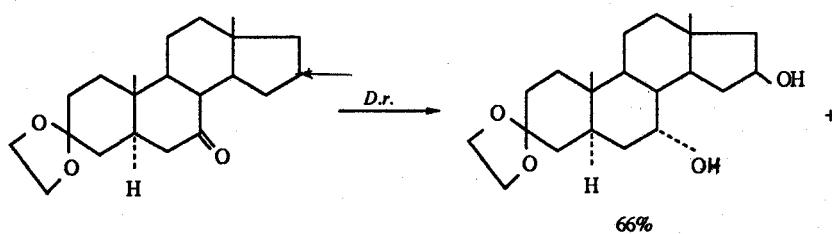
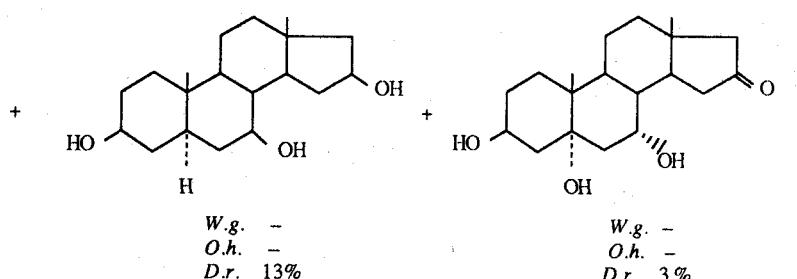
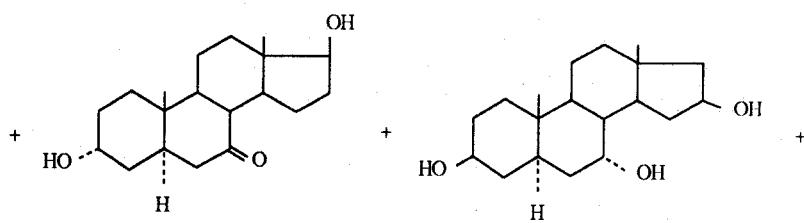
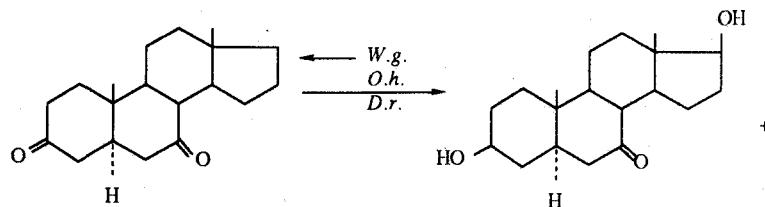




субстраты (табл. 2) [27, 28]. Дикислородзамещенные 5 α -андростаны с одной кетогруппой в терминальном кольце (2-, 3- или 17-) и другой — в среднем (7- или 11-) гидроксилируются легко и всегда в другое терминальное кольцо независимо от используемого микроорганизма, причем замена кетогруппы на гидроксильную оказывает незначительное влияние на процесс гидроксилирования. Четко просматриваемая тенденция к преимущественной атаке определенных положений стероидного ядра (чаще 3-, 7-, 16- или соседние к ним) характерна для всех трех культур (схема 12).

Схема 12

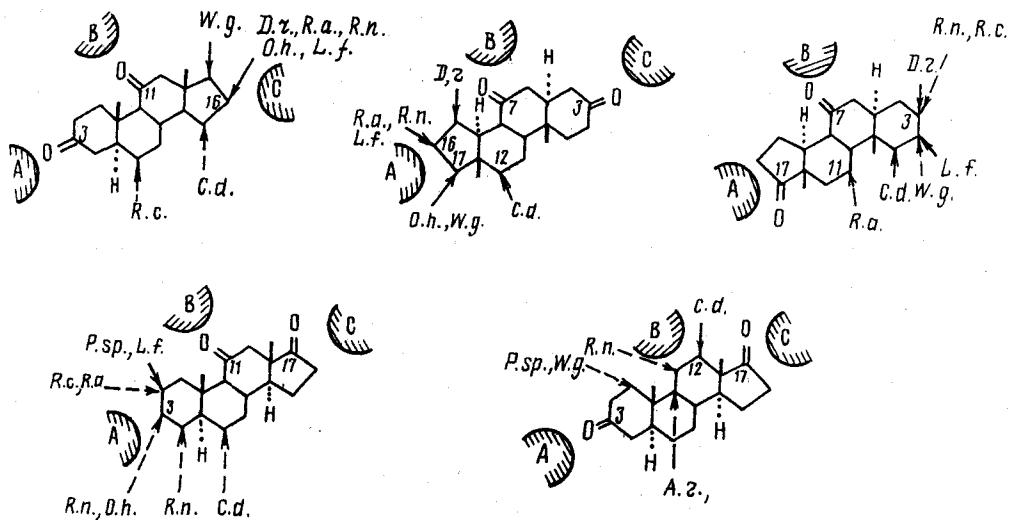




7%

На схеме 13 суммированы обсужденные выше данные по окислению 5 α -андростанов, включенные в табл. 2, 3 (не рассматриваются результаты трансформации грибами не идентифицированными до рода). Эти результаты в большинстве случаев укладываются в рамки модели фермент-субстратной специфичности Джонса—Криндла. Так, при связывании по сайтам А и В или В и С гидроксилирование происходит соответственно по сайтам С или А (структуры 3,11-(CO)₂, 3,7-(CO)₂, 7,17-(CO)₂ и 11,17-(CO)₂), а при связывании по сайтам А и С, все грибы, подчеркнем, представители разных классов, вводят аксиальную гидроксигруппу (за исключением *C.d.*), в положения молекулы, ориентированные по сайту В. Одновременно один из связывающих центров может выполнять функцию гидроксилирования, и в таком случае образуются дигидроксилированные продукты. Если же этого не происходит, то образуются монодигидроксилированные продукты, что наблюдается при трансформации дизамещенных андростанов в подавляющем большинстве случаев. Аналогично протекают превращения андростановых субстратов при замене кетогруппы на гидроксильные, а также 3-, 17-моно- и диацеталей, 2 α , 3 α -эпоксидов, но не 2 β , 3 β - и не 16 α , 17 α -, 16 β , 17 β -эпоксидов.

Схема 13



Не поддаются объяснению результаты гидроксилирования *A.r.* [33], которая вводит в 3,17-дикетон 11 α -либо 9 α -гидроксигруппу в зависимости от присутствия в среде двухвалентного кобальта. Если субстратами служат 3 β - или 17 β -кетоспирты, то гидроксигруппа вводится в 9 α -положение, независимо от наличия Со. Однако в его отсутствие выход 9 α -гидроксипродуктов в 2 раза ниже. Исключительность этих данных состоит также в том, что соли тяжелых металлов, в том числе Со, полностью ингибируют действие 9 α -гидроксилаз бактериального происхождения [2] (схема 14).

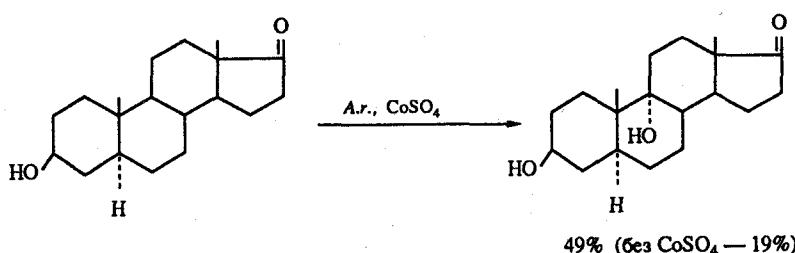
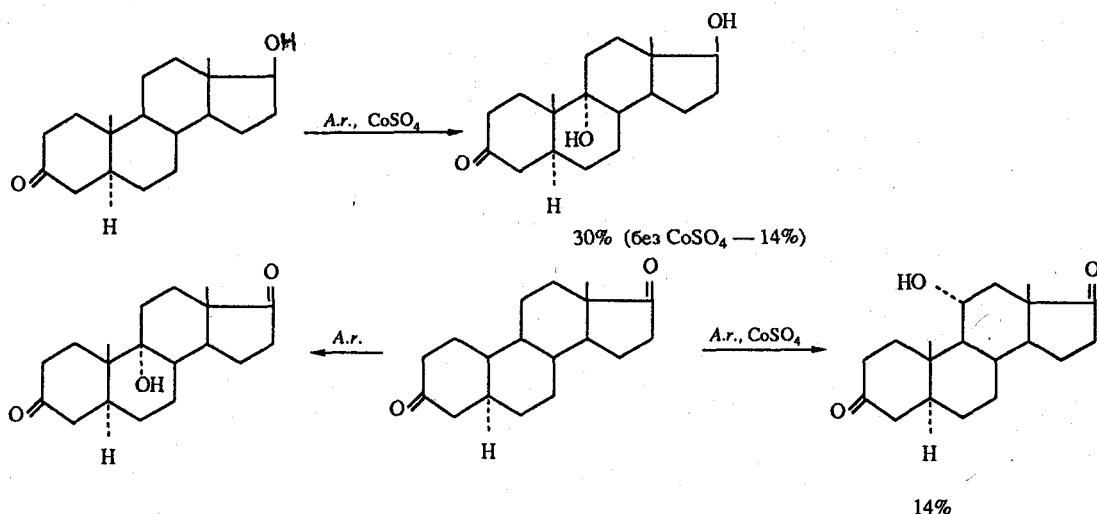


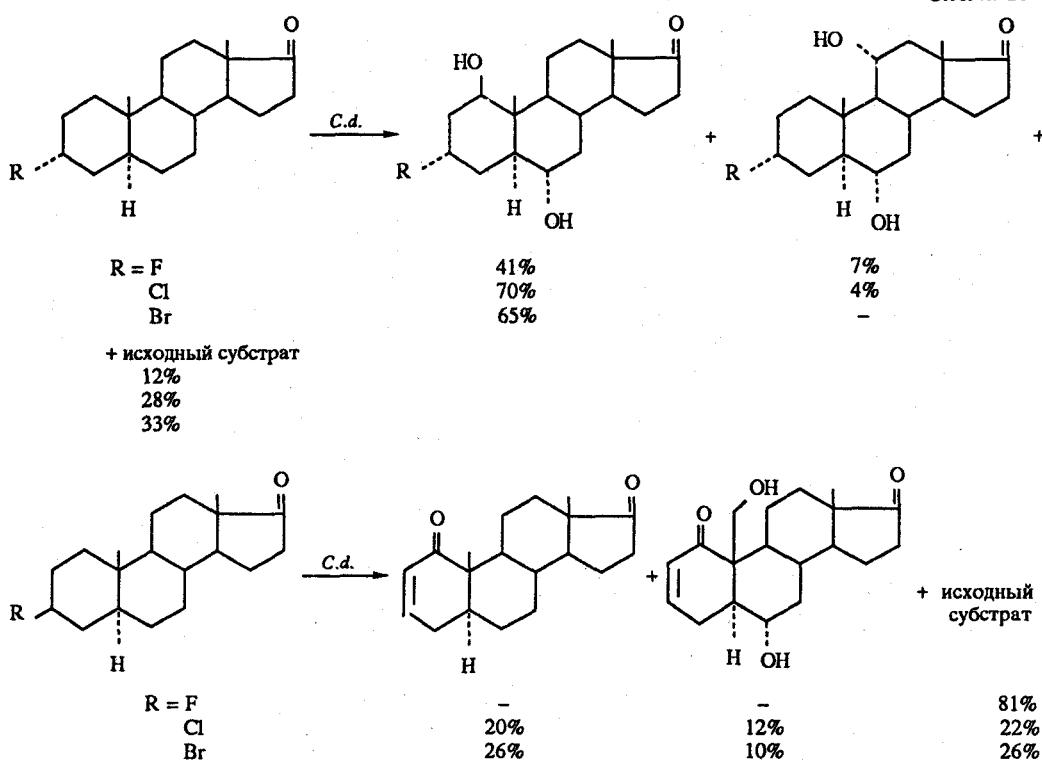
Схема 14



IV. ТРАНСФОРМАЦИЯ ГАЛОГЕНЗАМЕЩЕННЫХ 5α-Н-АНДРОСТАНОВ

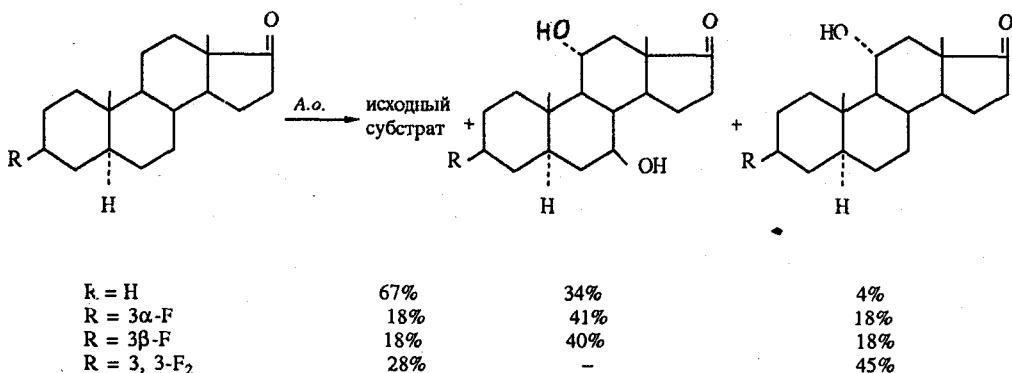
Для выяснения влияния галогензаместителей на процесс гидроксилирования 5α-Н-андростанов (3-, 16-, и 17-кето) ряд моно-галоген (3-, 6-, 17-) и гем-дифторзамещенных (6-, 7-, 12-, 16-, 17-) субстратов инкубировали в стандартных условиях с *C.d.*, *R.p* и *A.o.* [34, 36] и результаты сравнивались с полученными для родственных незамещенных 5α-Н-андростанов. Оказалось, что каталитические свойства биокатализатора определяет атом галогена: его природа, положение и конфигурация. Иллюстрацией этому служат результаты гидроксилирования 3α- и 3β-галоген5α-Н-андростанонов-17

Схема 15



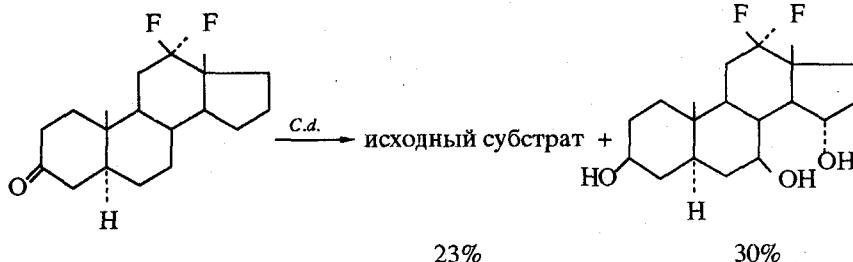
(схема 15). Другой порядок активности галогенированных субстратов обнаружен в случае 17 α -галогенированных 5 α -Н-андростанонов-3: здесь хлорзамещенные — неактивны с *C.d.*, фтор — подвержены 12 β , 15 α -дигидроксилированию (как и незамещенные 3-кето-5 α -Н-андростаны, табл. 3). Четкое и весьма полезное различие существует между F-кетонами с одной стороны и Cl, Br-кетонами при гидроксилировании 3- и 17-кетоандростанов *A.o.* Например, 3 α -Cl- и Br-производные не реагируют, тогда как 3 α -F-кетон эффективно гидроксилируется этой культурой в положение 11 α . Весьма существенный вывод, сделанный при исследовании широкого набора фторированных 5 α -андростанов, состоит в том, что атом фтора, удаленный от специфичного для каждого 5 α -андростанона (и микроорганизма) центра атаки, облегчает процесс гидроксилирования, не меняя его направления. Четко это прослеживается на 11 α -гидроксилирующей культуре *A.o.*, которая в отличие от *C.d.* и *R.n.* проявляет низкую субстратную специфичность. Представленные на схеме 16 результаты демонстрируют не только явно выраженное индуцирование процесса гидроксилирования 3-F-заместителем, но и возможность направленного 11 α -гидроксилирования 17-кето-5 α -андростанов этой культурой (сравни с табл. 3).

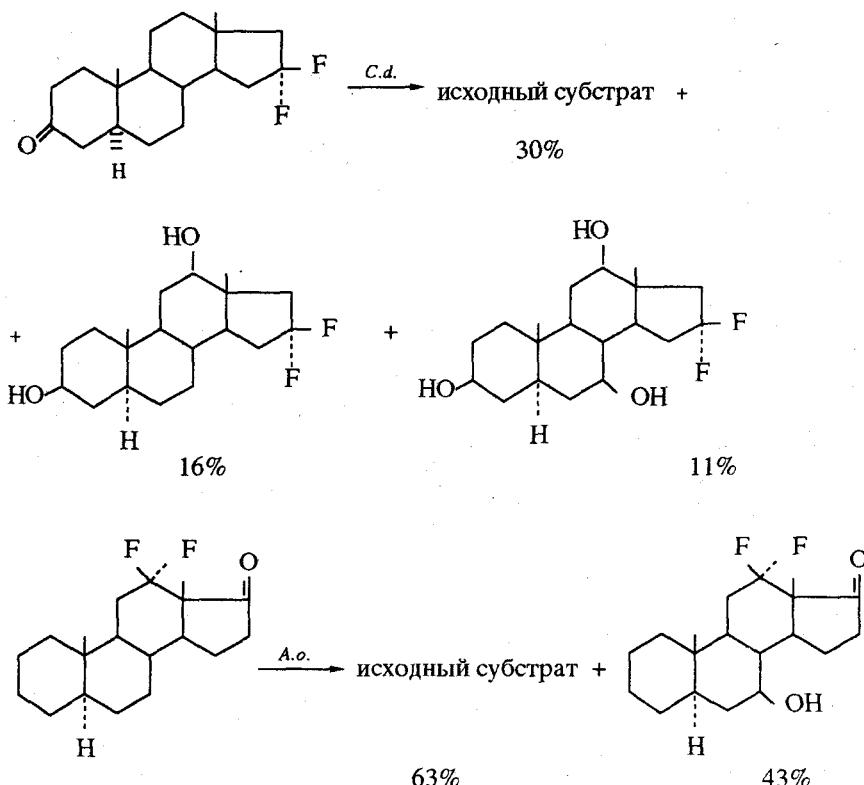
Схема 16



Напротив, атом хлора, близлежащий к стандартным точкам атаки, как правило, блокирует процесс гидроксилирования в эти стандартные или соседние положения или же направляет его по «альтернативному» пути. Например, свойственное 3-кето-5 α -Н-андростанам 12 β , 15 α -дигидроксилирование культурой *C.d.* не обнаружено в реакциях с 12,12-дифтор- и 16,16-дифтор-3-кетонами, где главными направлениями атаки являются соответственно 7 β , 15 α - и 7 β , 12 β -атомы. Показательным примером такого смещения центра атаки является результат гидроксилирования 12,12-дифтор-17-кетоандростанов в 7 β -гидроксипроизводное. Этот результат особенно поразителен в том плане, что для осуществления 6 β - или 7 α -гидроксилирования этим ферментом необходимо наличие 11 α -оксигруппы, а моногидроксилирование всегда протекает только в 11 α -положение [76] (схема 17).

Схема 17





V. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5α-Н-Д-ГОМОАНДРОСТАНОВ

С целью выявления дополнительных факторов, определяющих фермент-субстратное взаимодействие, группы исследователей Венесуэлы и Великобритании [89—96] провели анализ влияния *A*- и *D*-гомологизации в ряду 5α-Н-андростанов на процесс гидроксилирования тремя культурами — *A.o.*, *R.l.* [80, 81] и *C.el.* Сравнение полученных данных с результатами трансформации аналогично замещенных 5α-Н-андростанов позволило заключить, что, во-первых, и на *D*-гомостероидах культура *A.o.* проявляет узкую сайт-специфичность, гидроксилируя их только в 11α-положение (табл. 4). Во-вторых, соединения этого ряда не индуцируют синтез второй гидроксилазы, что дополнительно подтверждается отсутствием гидроксилирования 3,11-дикислородзамещенных *D*-гомо-5α-андростанов. Следует заметить, что эти же соединения не гидроксилируются и культурой *R.l.*, что говорит в пользу высказанного ранее предположения о том, что в клетках *R.l.* могут также функционировать две гидроксилазы, но не столь специфичные, как у *A.o.* В основном же результаты гидроксилирования *D*-гомо-5α-андростанов *R.l.*, по мнению авторов [80, 81], хорошо укладываются в рамки механизма Джонса, с позиций которого могут быть объяснимы почти все полученные данные. В этом ряду редко наблюдается нормальный способ гидроксилирования и практически все изученные субстраты гидроксилируются альтернативным способом, причем реакции в большей степени сопровождаются восстановлением кетогруппы. Исключение составляет *D*-гомо-5α-Н-андростан-3,17-дион, гидроксилирующийся до некоторой степени нормальным способом в 11α-положение. Но как только 3-кетогруппа восстанавливается до 3β-гидроксигруппы, благоприятно ориентированной для связывания альтернативным способом, процесс

Таблица 4

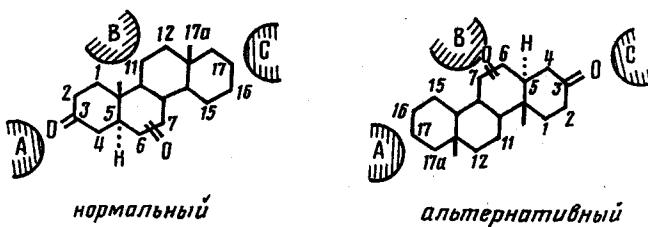
Гидроксилирование *D*-гомо-5 α -Н-андростанов различными культурами

Заместители	Культура	Исходное, %	Главные направления	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a	Ссылки
2,17 α -(CO) ₂	R.n.	14	6 α и 7 α	20	2-CO \rightarrow 2 α -OH	14	[81]
3,6-(CO) ₂	R.n.	47	17 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	17	3-CO \rightarrow 3 α -OH	6	[81]
3,7-(CO) ₂	R.n.	7	17 α	31	—	—	[81]
3,17-(CO) ₂	R.n.	—	7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH); 11 α (3-CO \rightarrow 3 α -OH)	20 29	3-CO \rightarrow 3 α -OH	45	[81]
3,17 α -(CO) ₂	R.n.	35	—	—	3-CO \rightarrow 3 α -OH	19	[81]
11 α -OH, 3-CO	R.n.	39	—	—	3-CO \rightarrow 3 β -OH	11	[81]
3 β -OH, 17 α -CO	R.n.	0	7 β (17-CO \rightarrow 17 α -OH)	18	17-CO \rightarrow 17 α -OH	19	[81]
7 β -OH, 17 α -CO	R.n.	50	7 β	47	17 α -CO \rightarrow 17 α -OH	10	[81]
3 α -OH, 17 α -CO	R.n.	50	7 продуктов				[81]
6-CO	A.o.	90			7 β -OH \rightarrow 7-CO	21	[80]
2,17 α -(CO) ₂	A.o.	61	11 α	65	—		[80]
3,6-(CO) ₂	A.o.	50	11 α	29	—		[80]
3,7-(CO) ₂	A.o.	24	11 α	20	—		[80]
3,11-(CO) ₂	R.n., A.o.	10	Не выделены				[80]
3,17-(CO) ₂	A.o.	24	11 α	79	—		[80]
3,17 α -(CO) ₂	A.o.	0	11 α	73	—		[80]
11 α -OH, 3-CO	A.o.	85	Не выделены				[80]
3 β -OH, 17 α -CO	A.o.	38	11 α	46	3 β -OH \rightarrow 3-CO	41	[80]
3 β -OAc, 17 α -CO	A.o.	—	11 α	—			[94, 95]
3 α -OH, 17 α -CO	A.o.	33	11 α	48	—		[80]

3,17-(CO) ₂	C.el.	-	7 α , 9 α 9 α , 14 α	35 20	7 α 3-CO \rightarrow 3 β -OH	2	[94, 95]
3,17a-(CO) ₂	C.el.	-	7 α , 14 α	33,5	7 α 1 β , 3 β , 7-CO 1 β , 7 α 1 β , 7 β	2 1,5 3,2 1,2	[94, 95]
3 β -OAc, 17-CO	C.el.	-	9 α , 14 α	36	-	-	[95]
3 β -OAc, 17a-CO	C.el.	-	7 β (3 β -OAc \rightarrow 3 β -OH) 7 α (3 β -OAc \rightarrow 3 β -OH)	29 9	1 β , 7-CO 1 β , 6 β 7-CO	4 4 0,6	
3 β -OH, 17a-CO	C.el.	-	1 β , 7-CO 1 β , 7 β 1 β , 7 α	4 4 10	- - -	-	[95]
17-CO	C.d.	-	6 α , 17 α 7 β , 12 β , 15 α 1 β , 7 β , 15 α	10 11 6	- - -	-	[19]
17a β -OH, 17a α -Me- 3,17-(CO) ₂	C.cl.	-	11 β 6 α	2 4	11 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 6 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	8 3	[117]

начинает протекать именно в этом направлении с образованием 7β -гидроксипроизводных. Напротив, $3,17a$ -*D*-гомокетон (табл. 4) не гидроксилируется даже альтернативным способом вследствие того, что первоначально образующееся его 3α -гидроксипроизводное, имея неблагоприятную для связывания по сайту С ориентацию гидроксильной группы, гидроксилируется с образованием многокомпонентной смеси неидентифицированных продуктов. Вероятно, этот последний результат дает основание для общего вывода о гидроксилировании стероидов: если структура субстрата не способствует хорошему связыванию с ферментом, то оно осуществляется с различным образом ориентированными молекулами, приводя к неоднородному процессу гидроксилирования или восстановлению кетогруппы.

В отличие от 5α -андростанов, $3,6$ - и $3,7$ -дикетоны которых гидроксилируются *R.p.* в 16α - и 16β -положения, соответствующие *D*-гомостероиды образуют $17a\alpha$ -гидроксипродукты [81]. Авторы полагают, что указанные *D*-гомостероиды гидроксилируются альтернативным способом по сайту А, следствием этого же пути гидроксилирования является образование 16α -гидрокси- 5α -андростан-3,6-диона, тогда как 16β -эпимер образуется нормальным способом трансформацией по сайту С, если, конечно, в процессе не принимают участие «скрученные» формы молекул (схема 18).



К сожалению, отсутствуют столь же систематизированные исследования гидроксилирования *D*-гомо 5α -Н-андростанов другими культурами. Хотелось бы, однако, отметить различное поведение дигидроксилирующей культуры *C.el.* по отношению к 5α -Н-андростанону-17 (табл. 3) и его *D*-гомоаналогу (табл. 4): 1β , 6α -дигидроксилирование в первом случае и преимущественно тригидроксилирование (7β , 12β , 15α и 1β , 7β , 15α) — во втором.

Имеющиеся, хотя и немногочисленные, результаты гидроксилирования двух пар $3,17$ -дикислородзамещенных *D*-гомо- 5α -Н-андростанов культурой *C.el.* (табл. 4) в сравнении с данными окисления этой культурой соответствующих аналогов 5α -Н-андростана (табл. 2) также могут быть интерпретированы в рамках упомянутой выше модели гидроксилирования. Обращает внимание поразительное различие, особенно заметное в ряду $17a$ -*D*-гомокетонов, в направлении гидроксилирования *D*-гомо- 5α -Н-андростан-17(или $17a$)-онов при замене 3 -кетогруппы на 3β -ацетатную, гидролизующуюся в процессе реакции (табл. 4, схема 19). Приведенные ниже данные

Схема 19

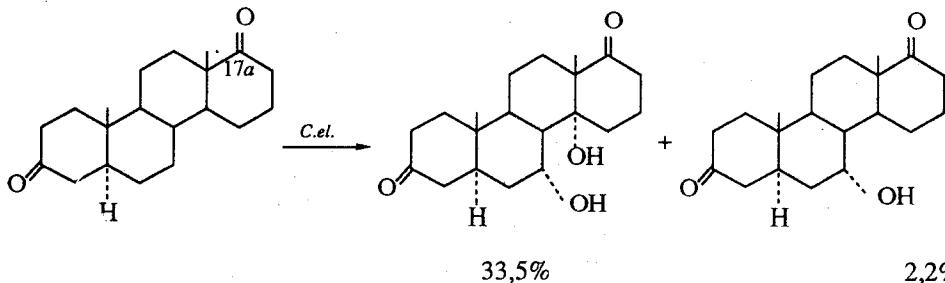
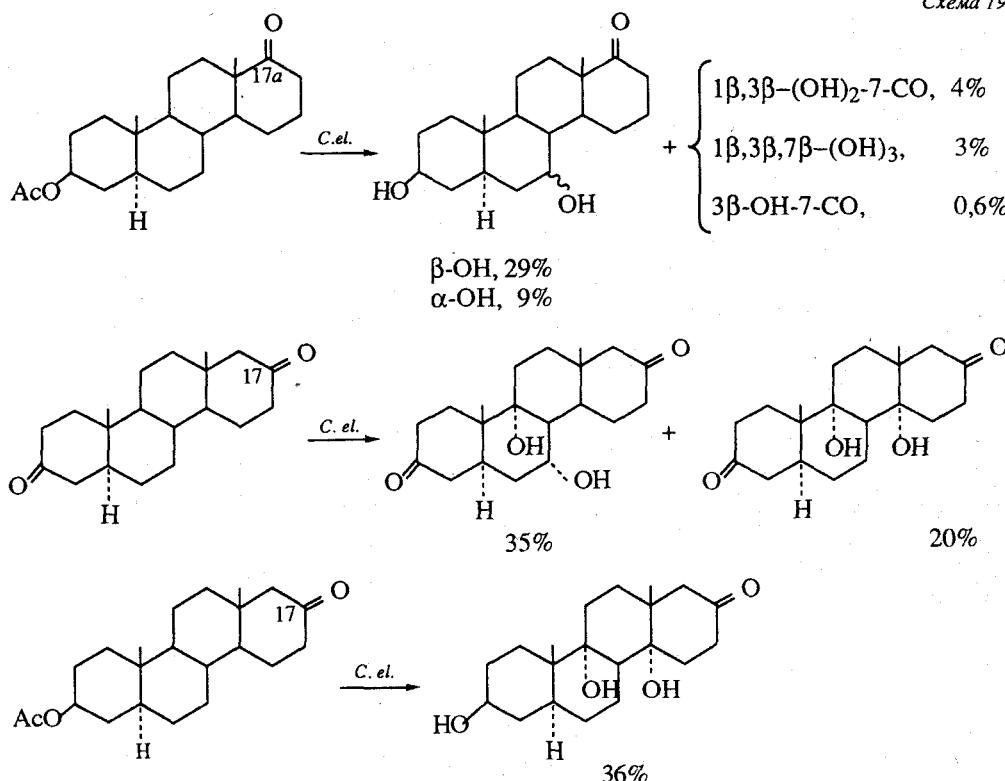
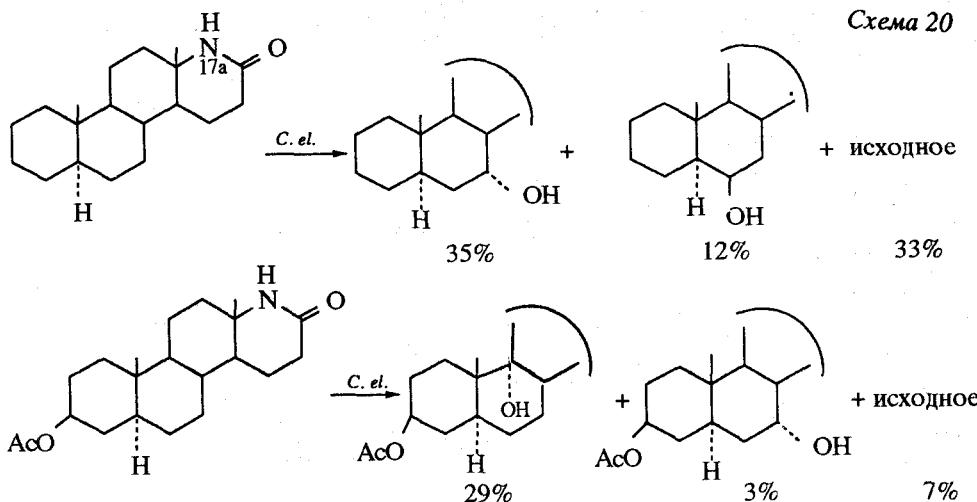


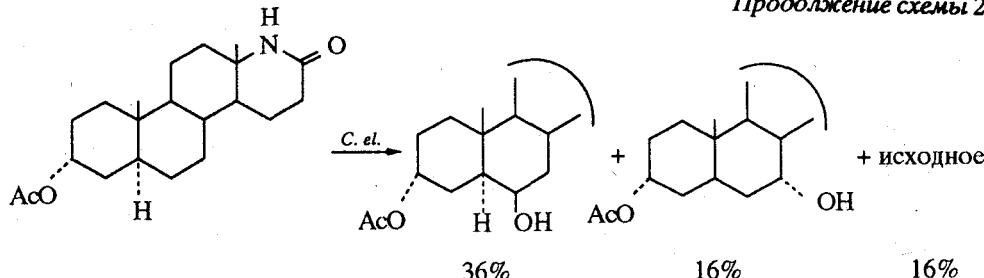
Схема 19



убедительно показывают также существенную зависимость направления гидроксилирования от положения кетогруппы в кольце *D*. Так, если главным продуктом инкубации 3β-ацетокси-17a-*D*-гомокетона является 7β-гидроксипроизводное, то трансформация его 17-кетоаналога дает преимущественно 9α,14α-дигидроксипроизводное. Отметим, что введение атома азота в положение 17a *D*-гомо-5α-Н-андростанона-17, вероятно, ингибирует процесс 14α-гидроксилирования этой культурой. Так, для 3β-ацетокси-17a-аза-*D*-гомо-5α-Н-андростанона-17 (схема 20), в отличие от его карбоаналога (схема 19), наблюдается только моногидроксилирование, преимущественно в 9α-положение [90, 92]. На примере трансформации 17a-аза-5α-Н-андростанов культурой *C. el.* четко прослеживается влияние замещения при C(3) на

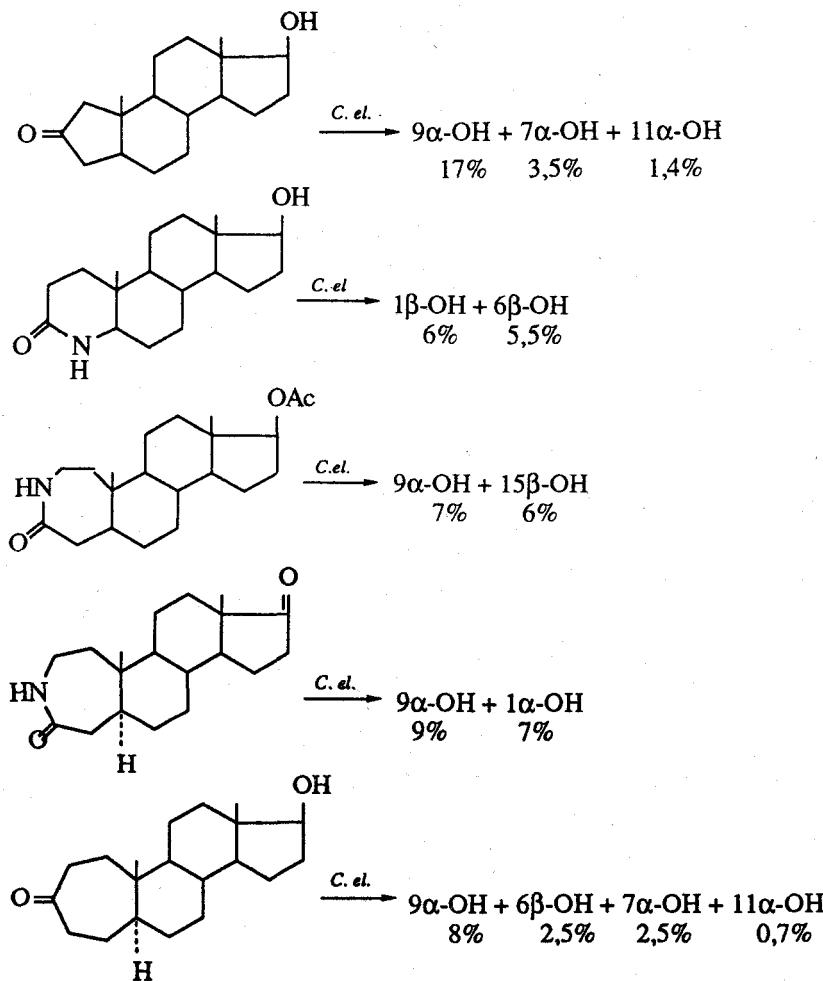
Схема 20





направление гидроксилирования. Изменение структуры кольца *A* 5*α*-Н-андростанов вносит не менее существенные изменения в направление гидроксилирования этой структурой. В серии работ Краба с соавт. [86—96] исследовано влияние колец *A* и *D* на гидроксилирование культурой *C.el.* Анализ этих данных не позволил выявить определенных корреляций. Можно лишь отметить, что *A*-нор-, *A*-гомо- и аза-*A*-гомо-5*α*-Н-андростаны, независимо от замещения в кольце *D*(CO- или OH-группа), проявляя склонность к моногидроксилированию (преимущественно в 9*α*-положение), тем не менее трансформируются с низкой степенью конверсии (схема 21). В отличие от *C.el.* культура *A.o.* гидроксилирует *A*-гомо-3,17-дикетон в типичное для нее положение, образуя 11*α*-гидроксипродукт с выходом 58% [93].

Схема 21



VI. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5 α -Н-ПРЕГНАНОВ

Практическая направленность использования 5 α -Н-прегнанов в синтезе кортикоидов, вероятно, определила выбор гидроксилирующих микроорганизмов и субстратов, набор которых в сравнении с 5 α -Н-андростанами весьма ограничен. В ряду 5 α -Н-прегнанов исследованы культуры, известные своей способностью к гидроксилированию Δ^4 -3-кетостероидов в положения: 11 β -(*Curvularia, Cunninghamella, Tieghemella*), 11 α -(*Rhizopus, Aspergillus*), 12 β -(*Calonectria decora*) [2, 6—11]. Из 5 α -Н-прегнанов получены также 9 α -гидроксипроизводные [118—122], но этот тип трансформации целесообразно рассмотреть изолированно, поскольку он осуществляется бактериями и в отличие от гидроксилирования грибами, протекает как стадия микробиологического расщепления стероидной молекулы после введения Δ^4 -3-кетогруппировки [2, 6—9].

Введение гидроксильной функции в положения C(9), C(11 α) и C(12) обеспечивает их дальнейшее превращение в 11 β -гидроксипроизводные химическими методами. Из тех же практических соображений в качестве субстратов изучены в основном 3 β -гидрокси- и чаще 3-кето-5 α -Н-прегнаны. Исследования, выполненные на соединениях этого ряда, не носят столь фундаментального характера, как на 5 α -Н-андростанах, и полученные результаты, суммированные в табл. 5, не дают возможности выявления строгой корреляции во взаимодействии фермента с субстратом. Однако несколько систематических исследований субстратной специфичности ряда культур представляют несомненный интерес.

Продолжая работы по исследованию фермент-субстратного взаимодействия, Джонс с соавт. [35] перенесли их на соединения прегнанового ряда, безусловно допуская, что при наличии вращательной способности боковой цепи в модель, построенную на данных андростанового ряда, могут быть внесены определенные корректизы. Они исследовали набор микроорганизмов наиболее эффективных при трансформации 5 α -Н-андростанов: A.o., три вида *Rhizopus*, C.d., D.r. [35]. К сожалению, не располагая столь вариабельным набором субстратов, как в андростановом ряду, авторы вынуждены были ограничиться 3-, 7- и 11-кислородзамещенными 20-кето-5 α -Н-прегнанами (табл. 5). Из-за отсутствия количественных данных по трансформации замещенных 20-кетопрегнанов культурой A.o. возможен лишь качественный анализ результатов. 5 α -Н-Прегнан практически не трансформируется A.o., или же образуется сложная смесь неидентифицированных продуктов. При инкубации с 3,20-дикетопрегнаном трансформация протекает по обычному для этого микроорганизма пути с образованием 11 α -гидроксипродукта. Однако при инкубации с 3 β -оксианалогом после введения 11 α -гидроксигруппы наблюдается нетипичное для A.o. гидроксилирование в 1 β -положение. При длительной инкубации (6 суток) 3 β -гидрокси-5 α -Н-прегнан-20-он дает смесь 1 β , 11 α -ди и 11 α -моногидроксипроизводных, причем дигидроксипродукт образуется не синхронно, а последовательно через 11 α -моногидроксипродукт (табл. 5). Отмечено [25], что 1 β , 11 α -дигидроксилирование характерно для 16 β -Ме-, Δ^{16} - и 16 α , 17 α -эпоксианалогов 3 β -гидрокси-5 α -Н-прегнан-20-она, но не наблюдается в случае их 17 α -гидрокси- и 16-Ме- Δ^{16} -производных. Поведение 2,20- и 3,20-дикетонов [25] 5 α -Н-прегнана резко контрастирует с поведением 3 β -гидроксианалогов, давая исключительно продукты 11 α -моногидроксилирования. Следует заметить при этом, что соответствующие Δ^4 -3-кетоаналоги количественно превращаются в 6 β , 11 α -дигидроксипроизводные.

Любопытный результат получен гидроксилированием стероидных алкалоидов фунтумидина (3 α -NH₂) и фунтумина (3 α -NH₂, 20 α -OH), гидроксилирующих A.o. в 12 β - и 11 α -положения [98]. Из результатов следует, что природа и стереохимия замещения при C(3) весьма существенно влияют на процесс гидроксилирования 5 α -Н-прегнанов микроорганизмом A.o.

Микроорганизм C.d. дигидроксилирует 3-кето- и 3 β -гидрокси-20-кето-5 α -Н-прегнаном в 12 β , 15 α -положения, при блокировании C(12) атома 11 α -гидроксильной группы атака направляется исключительно по C(15) и в этом проявляется сходство этой

Гидроксилирование замещенных 5 α -Н-прегнан-20-онов плесневыми грибами

Заместитель	Микро-организм	Исходное, %	Основное направление	Выход, %	Побочное направление	Выход, % ^a	Ссылки
—	L.f.	19	Не выделен	—			[37]
—	A.o.	91	Не трансформируется	—			[25]
2-CO	A.o.	0	11 α	50	—	—	[25]
3-CO	A.o.	28	11 α	38	11 α , 17 β	9	[25]
3-CO	C.d.	—	12 β , 15 α	40	—	—	[100, 102]
3-CO	D.r.	0	7 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4 5	3-CO \rightarrow 3 β -OH	5	[35]
3-CO	R.a.	14	11 α	12	7 β , 11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	7	[35]
3-CO	R.c.	7	11 α 11 α , 17 β 11 α , 17-CO	9 4 7	11 α , 17-CO(3-CO \rightarrow 3 β -OH) — 11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4 — 3	[35]
3-CO	A.t.	17	11 β	10		5	[4]
3-CO	S.e.	—	11 α	—			[63]
3-CO	C.sp.	—	9 α	—			[67]
3-CO	R.n.	25	11 α	22	7 β , 11 α (3-CO \rightarrow 3-OH) 11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 3-CO \rightarrow 3 β -OH	7 5 3	[35]
3-CO	R.n.	60	11 α	40			[112]
7-CO	C.d.	45*	12 β	18			[35]
7-CO	C.d.	10**	1 α , 12 β	33	1-CO, 12 β	21	[35]
7-CO	D.r.	30	3 β (7-CO \rightarrow 7 α -OH)	13	3 β (7-CO \rightarrow 7 β -OH)	3	[35]
7-CO	R.n.	21	3 α , 11 α 3 β , 11 α 4 α , 11 α	10 14 12			[35]

3-CO-11 α -OH	C.d.	—	15 α	—		[100]
11-CO	D.r.	10	3 β	35		[35]
11-CO	R.n.	57	Не выделено			[35]
11-CO	C.d.	58	Не выделено			[35]
3 β -OH	R.n.	12*	7 β	15	7 β , 12 β	12
					11 α	7
3 β -OH	R.n.	10**	7 β , 12	22	7 β , 11 α	10
					7 β	8
					11 α	5
3 β -OH	R.a.	14	11 α , 7-CO	16	7 β	11
3 β -OH	R.c.	5	7 β	11	11 α	4
3 β -OH	A.o.	3	1 β , 11 α	57	1 β , 11 α (3 β -OH \rightarrow 3-CO)	8
3 β -OH	A.n.	—	1 β , 11 α	—		[17, 25]
3 β -OH	D.r.	17	7 α	9		[38]
7 α -OH	C.d.	26	12 β	17		[35]
7 α -OH	D.r.	9	3 β	27		[35]
7 α -OH	R.n.,	53	3 β	24		[35]
11 α -OH	R.n., C.d.	58	Не выделено			[35]
11 α -OH	D.r.	10	3 β	35		[35]
11 β -OH	C.d., D.r., R.n.	64—71	Не выделено			[35]
3 β -OH- Δ^{16}	C.d.	21	Не выделено			[35]
3 β -OH- Δ^{16}	D.r.	8	14 α , 15 β	21		[35]
3 β -OH- Δ^{16}	R.n.	16	7 α , 15 α	12		[35]
			7 α	13		
3 β -OH-11-CO	P.f.	—	7-CO, 15 β	12		[64]

Заместитель	Микро-орга-низм	Исход-ное, %	Основное направление	Выход, %	Побочное направление	Выход, %	Ссылки
3 β -11 β -(OH) ₂	D.v.	—	11 α	—			[64]
3 β , 21-(OH) ₂	R.a.	—	7 β	—			[69]
3 β -OH-5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	24—45			[105, 106]
3 β , 21-(OH) ₂ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	16			[105]
3 β -OH-21-OAc-5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	50			[105, 106]
3 β , 17 β -(OH) ₂ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	20			[105]
3 β , 17 α , 21-(OH) ₃ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	16			[105]
3 β , 17 α -(OH) ₂ -21-OAc-5, 6-O	C.l.	—	11 β	28			[105]
3 β , 17 α , 20 α -(OH) ₃ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	33			[105]
3 β , 20 β -(OH) ₂ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	52			[105]
3 β -OH-16 α -Me-5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	45			[106]
3 β , 20 α -(OH) ₂ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	8			[105]
3 β , 20 β , 21-(OH) ₃ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	10			[105]
3 β -OH-21-OAc-16 α -Me-5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	55			[105]
3 β -OAc-21-OAc-16 α -Me-5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	36			[105]
3 β , 21-(OH) ₂ -5, 6 α -O-17 α , 20-O	C.l.	—	11 β	28			[105]
3 β -OH-5, 6 α -O-16, 7 α -O	C.l.	—	11 β	45			[105, 106]
3 β , 17 β -(OH) ₂ -5, 6 α -O	C.l.	—	11 β	31—45			[105, 106]
3 β -OH-16, 17 α -O	A.o.	—	1 β , 11 α				[38]

$3\beta, 21-(OH)_2-5\alpha-Br-6\beta-F-16\alpha-Me$	C.l.	-	11β	45	$3\beta-OH-5\alpha-Br-6\alpha-F-\Delta^4-3-keto-6\alpha-F$	[68]
$3\alpha-NH_2$	A.o.	-	12β	6,7	11α	8,5 [98]
$3-CO-11\alpha-OH$	C.d.	-	15α	60		[100, 102]
$3-CO-16, 17\alpha-O$	R.n.	-	11α	60		[111]
$3-CO-21-OH-16\beta-Alk$	G.l.c.	-	11α	-		[58]
$3-CO-21-OH-16\alpha-tr.Bu$	Ph.sp.	-	11β	-		[60]
			11α	-		
$3-CO-17\alpha, 21-(OH)_2$	C.l.	-	$11\beta, 14\alpha$	50—53		[107]
$3-CO-17\alpha, 21-(OH)_2$	C.bl.	-	11α	70—75		[107]
$3-CO-17\alpha, 21-(OH)_2$	T.o.	-	11α	40—45	11β	5 [107]
$3-CO-16\alpha, 17\alpha-21-(OH)_3$	C.l.	-	11β	38—42		[107]
»	T.o.	-	11α	30	11β	5 [107]
»	C.bl.	-	11α	60—65	11β	5 [107]
$3-CO-21-OH-16, 17\alpha-O_2CMe_2$	C.l.	-	11β	10—12		[107]
»	T.o.	-	11β	40—45	$11\alpha-OH$	5—8 [107]
»	C.bl.	-	11α	30—35		[107]
			11β	10—12	$11-CO$	5

Обозначения: инкубация стероида, растворенного в EtOH * — 1 сут,

** — 6 сут,

+ — 2 сут,

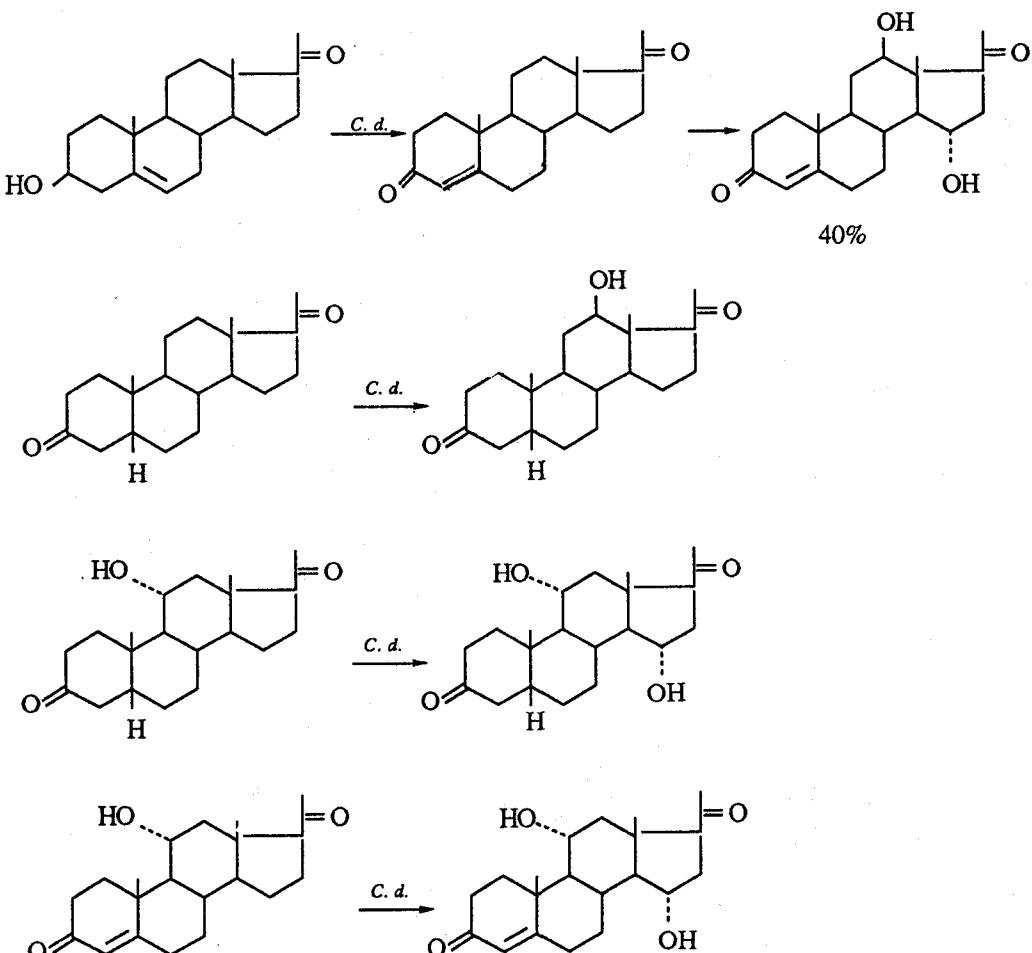
++ — 4 сут.

культуры с ее поведением в 5α -Н-андростановом ряду. Устойчивость этого направления гидроксилирования наблюдается для различных субстратов прегнанового ряда, независимо от наличия или отсутствия Δ^4 -, Δ^5 -двойной связи и даже сочленения колец A, B [100, 102]. Обращает внимание отраженное на схеме 22 свойство культуры *C.d.* одновременно с гидроксилированием изомеризовать 3-окси- Δ^5 -аналоги в Δ^4 -3-кетопроизводные.

Удивительной особенностью *C.d.*, является обнаруженное несвойственное ей 11α -гидроксилирование 3α , 6α -дигидроксизамещенных, проявившееся только в 5β -Н-прегнановом ряду [101]. Более ранние данные о 15β -гидроксилировании культурой *C.d.* [103] следует считать ошибочными.

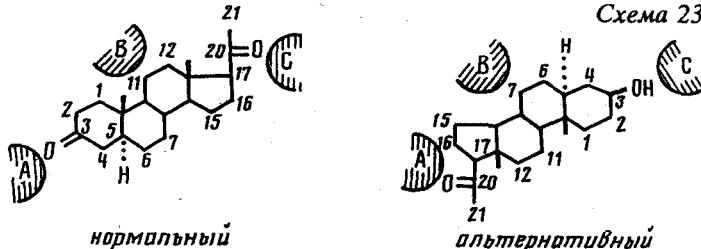
Три вида мукоровых грибов *Rhizopus*: *R.a.*, *R.c.*, *R.p.* изучены в отношении гидроксилирования 5α -Н-прегнанов. Различия между этими культурами подобны, но менее ощутимы по сравнению с теми, которые наблюдались с 5α -Н-андростанами [23, 24], тенденция к деградации боковой цепи наблюдается в трансформации с *R.p.*. Анализ результатов, представленных в табл. 5, указывает на отчетливо проявляющуюся склонность этого микроорганизма к преимущественному 11α -гидроксилированию 3-кетонов 5α -прегнана и 7β -гидроксилированию 3β -гидрокси- 5α -Н-прегнанов; некоторое отклонение наблюдается только для 3β -гидрокси- Δ^{16} -аналога, атакуемого

Схема 22



гидроксилазой, не только по С(7) (с α -области), но и в аллильное 15-положение. Нетипично для *R.l.* гидроксилирование в 12 β -положение при инкубации с 3 β -гидроксипрегнанолоном [35]. Мюррей и Петерсон [55] в более раннем патенте указывают, что *R.l.* гидроксилирует это соединение, так же как 3,20-дикетоаналог — в 11 α -положение. Общее сходство дифференцированного поведения 3-кето- и 3 β -гидроксипроизводных 5 α -Н-прегнанов и 5 α -Н-андростанонов-17 (или-16) указывает, вероятно, на возможность применения модели фермент-субстратного взаимодействия в 5 α -Н-прегнановом ряду, естественно с учетом стереохимических возможностей боковой цепи и условий связывания 20-кетогруппы (схема 23).

Схема 23



В отличие от 5 α -андростанов, которые гидроксилируются в 9 α -положение культурами *C.el.*, *D.c.*, *A.g.*, *W.g.*, *R.a.* (см. табл. 2, 4), только штамм *Circinella* sp. вводит 9 α -гидроксигруппу в 5 α -Н-прегнаны [67], это свойство проявляется также и на Δ^4 -3-кетопрегнане [123].

Серия представленных в табл. 5 данных трансформаций в 11 α -положение 3 β -гидрокси-5 α , 6 α -дизамещенных прегнанов микроорганизмом *C.l.* в контексте с предыдущим, показывает, что при блокировании гидроксилирования по С(7) (5,6 α -эпокси- или 6 β -F) реакция осуществляется исключительно по атому С(11). Эти же результаты подвергают сомнению официально бытующее мнение о невозможности гидроксилирования 3 β -гидрокси-ненасыщенных в кольце *A* прегнанов.

Все представленные в табл. 5 результаты трансформации 5,6 α -эпоксидов *C.l.* приведены из данных, полученных при кратковременной инкубации в расчете на максимальный выход целевого продукта — 11 β -гидрокси-5,6 α -эпокси-5-прегнанонов. Последующие исследования показали, что эта реакция идет с параллельным образованием 14 α -гидроксипроизводных [104], а длительная инкубация приводит к гамме продуктов [105], в которых направление гидроксилирования уже определяется имеющимися в молекуле 11 β - и 11 α -гидроксигруппами и 11-кетогруппой, непременно образующейся последующим окислением 11 β -гидроксигруппы [2, 6].

Так например, на схеме 24 представлена смесь продуктов, полученная при трансформации 3 β -гидрокси-5,6 α -эпокси-5-прегнан-20-она *C.l.* в течение 36 ч, в которой образование 7 α -гидрокси- и 17 α -гидроксипроизводных, по мнению авторов, можно считать следствием направляющего эффекта первично введенных в молекулу 14 α -окси- и 11-кетогрупп [105], а образование 11,14 α -дизамещенных — следствием взаимного влияния этих групп. Еще на одном примере покажем, что время трансформации — весьма существенный параметр в реакциях этого типа [105]. И здесь авторы полагают, что образование конечного продукта окисления — 11-кето-15 β -гидроксипроизводного происходит в результате последующего окисления обоих миорных продуктов (схема 25).

Замещенные в кольце *D* хорошо трансформирует *C.bl.* (17 α -гидрокси-, 16 α , 17 α -дигидрокси-, 16 α , 17 α -диоксизопропилен-) 3,20-дикето-5 α -прегнаны преимущественно в 11 α -положение, причем наличие в α -области стероидной молекулы 16 α -кислородсодержащего заместителя стимулирует конкурентное 11 β -гидроксилирование (табл. 5). Аналогично проявляется себя и культура *T.o.*, однако в этом случае 16 α , 17 α -ацетонидная группа блокирует практически полностью 11 α -гидроксилирование, способствуя процессу 11 β -гидроксилирования (схема 26).

Показанные на схеме 27 все три вида субстрата гидроксилируются *C.l.* в 11 β -

Схема 24

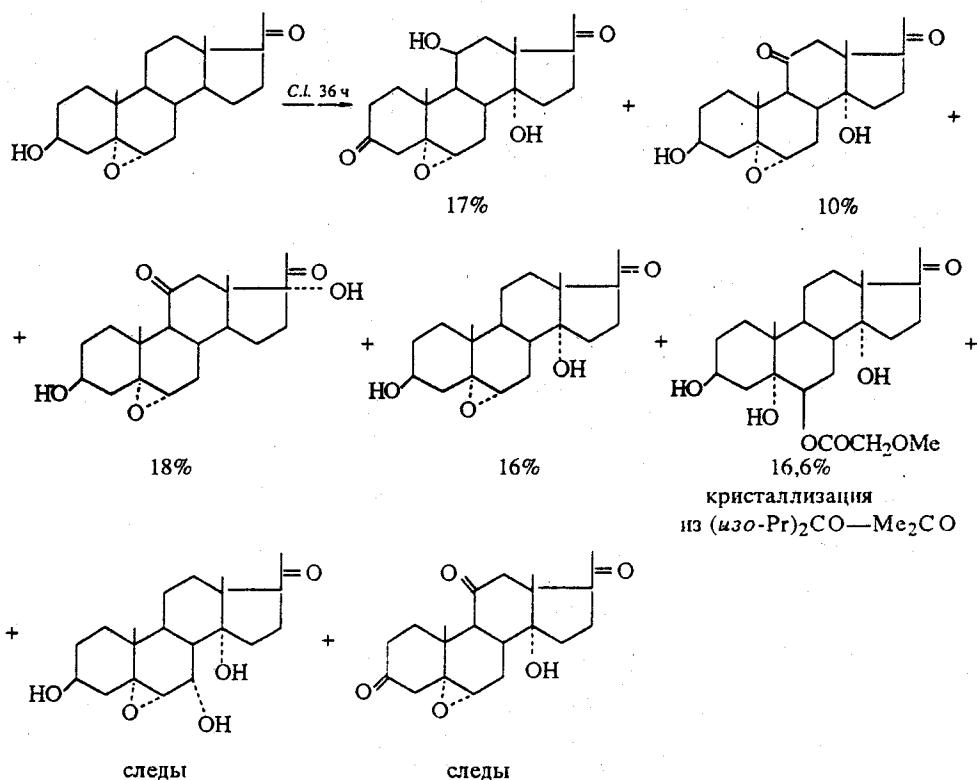


Схема 25

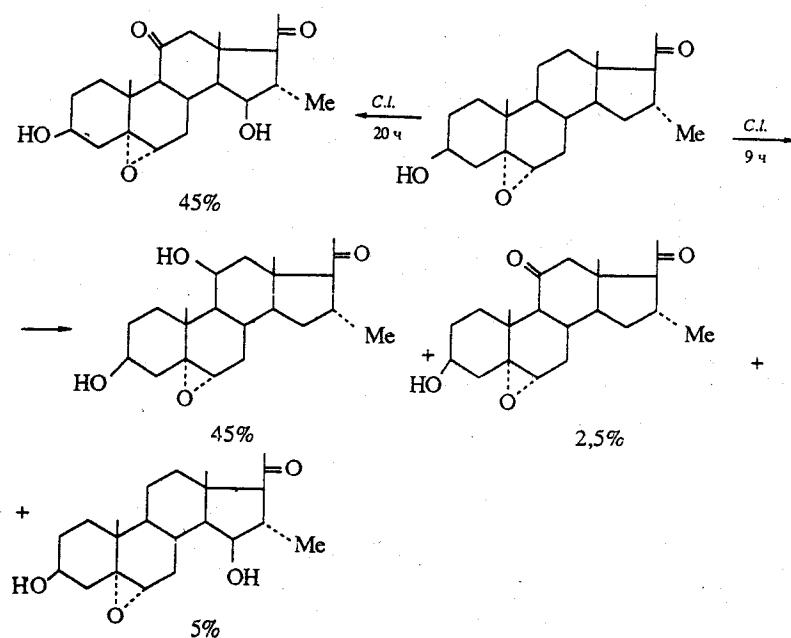


Схема 26

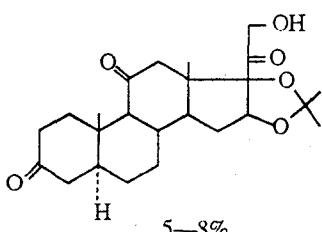
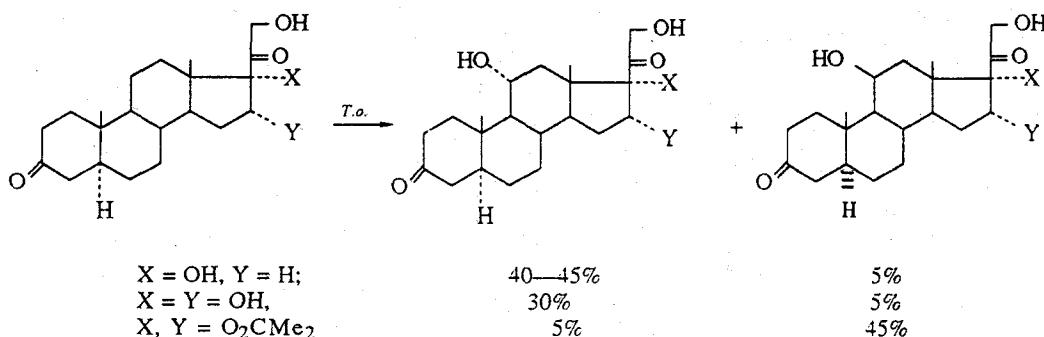
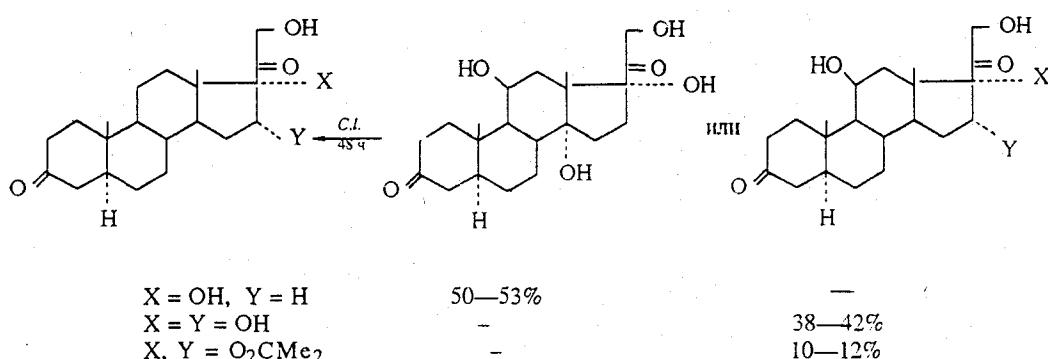


Схема 27



положение, а в случае 16-незамещенного соединения ($\text{X} = \text{OH}, \text{Y} = \text{H}$) наблюдается и последующее 14α -гидроксилирование, вероятно ингибируемое в двух остальных случаях кислородным атомом при C(16). Анализ методом ТСХ реакционной смеси через 24 ч инкубации $17\alpha, 21$ -дигидрокси- 5α -прегнан-3,20-диона показывает наличие 3-5% исходного субстрата, 14α - и 11β -моногидроксипроизводных (15 и 20% соответственно) и $11\beta, 14\alpha$ -дигидроксипроизводного (30-35%), из чего следует, что 11β - и 14α -гидроксилирование осуществляется последовательно. Нельзя не отметить, что *C.l.* трансформирует кортексолон в смесь 11β - и 14α -моногидроксипроизводных (67% и 15% соответственно) [107], из чего авторы делают вывод, что 5α -Н-стериоиды пространственно менее затруднены, чем их Δ^4 -3-кетоаналоги. Благодаря этому введение гидроксильной группы в одно из положений не исключает возможности их переориентации относительно фермента, что приводит к образованию $11\beta, 14\alpha$ -дигидроксисоединений. По этой же причине, по мнению авторов [107], $16\alpha, 17\alpha$ -дигидрокси- 5α -прегнан-3-он более доступен трансформациям с *C.bl.* и *T.o.*, дающим 11α -гидроксигруппы с 65 и 30%-ным выходами соответственно, тогда как его Δ^4 -3-кетоаналог не трансформируется ни одной из обсуждаемых культур. Нам такая точка зрения не кажется убедительной; вероятно, объяснение наблюдаемым фактам следует

искать в общей модели субстрат-ферментного взаимодействия прогнанов, в которой кислородная функция в кольце D (ее природа, положение, стереохимия) должны не только принимать участие, но конкурировать с 20-кетогруппой при геометрически или стереохимически благоприятном способе связывания.

Анализируя данные табл. 5 с точки зрения модели фермент-субстратного взаимодействия Джонса можно заметить, что в целом они согласуются с положением о функционировании на поверхности фермента трех связывающих и одновременно гидроксилирующих сайтов. Действительно, прогнановые монокетоны, возможность связывания фермента с которыми реализуется только одним центром, практически не трансформируются, а при наличии двух терминальных кислородных групп в молекуле стероида гидроксилирование происходит по сайту B. При наличии второго кислородного заместителя в центре B, гидроксилирование может протекать по сайту A, если он не связан с молекулой стероида. В том случае, когда имеются три кислородных заместителя, соответствующие сайтам A, B и C, то продукты трансформации либо не удается выделить, либо, как это происходит у *C.d.* с 3,20-(CO)₂-11 α -ОН-прогнаном, гидроксилирование, по-видимому, катализирует один из связывающих сайтов (схема 23) [102].

К вышесказанному необходимо добавить, что трансформация 5 α -Н-прогнанов выполнена также с помощью неидентифицированных до вида стрептомицетов и *S. roseochromogenes*, которые вводят 16-гидроксильную группу в 3-кето- и 3 β -гидрокси-5 α -Н-прогнаны [108, 109], так же как и в соединения с Δ^4 -3-кетогруппировкой. Вероятно, механизм гидроксилирования кольца D этими представителями класса *Schizomycetes*, так же как и 9 α -гидроксилирование с *Rhodococcus* [118—122], отличается от предложенного Джонсом с соавт. для грибов.

Анализ изложенных данных позволяет проследить, как специфическая способность микроорганизмов к гидроксилированию 5 α -Н-стериоидов зависит от типа стероида и характера заместителя в нем (кетон-, гидрокси-, ацетоксигрупп), их положения и стереохимии, количества. Это позволяет осуществить целенаправленное гидроксилирование стероидов в то или иное положение молекулы. Многочисленные примеры, суммированные в таблицах, показывают, что насыщенность колец стероидной молекулы не является препятствием для эффективного гидроксилирования. Это означает, что существует возможность изменения порядка превращения 5 α -Н-стериоидов в биологически активные препараты, предполагающая первоначальное их гидроксилирование и последующее дегидрирование кольца A. Обратная и общепринятая последовательность, заключающаяся в гидроксилировании первоначально полученных из 5 α -Н-стериоидов Δ^4 -3-Н-кето- (или $\Delta^{1,4}$ -3-кето)-производных, является предметом следующей части обзора, с акцентом на авторские исследования по использованию культуры *Rhodococcus*, катализирующей оба эти процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камерницкий А.В., Абубакиров Р.К., Горовец М.Б. и др. // Химия спиростанолов. М.: Наука, 1986.
2. Ахрем А.А., Титов Ю.А. // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. С. 251, 323.
3. Noguchi A., Fukushima D.K. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 1. P. 3552.
4. Brannon D.R., Parrish F.W., Wiley B.J., Long L. // Ibid. 1967. V. 32. № 5. P. 1521.
5. Kenney H.E., Weaver E.A., Wall M.F. // J. Amer. Chem. Soc. 1958. V. 80. № 20. P. 5568.
6. Ахрем А.А., Титов Ю.А. // Микробиологические трансформации стероидов. М.: Наука. 1965
7. Charney W., Herzog H.L. // Microbial Transformations of Steroids. N.Y.: Acad. Press, 1967.
8. Smith L.L. // Terpenoids and Steroids. 1974. V. 4. P. 394.
9. Kieslich K. // Microbial Enzymes and Bioconversions. L.: Acad. Press. 1980. P. 369.
10. Mahato S.B., Banerjee S. // Phytochemistry. 1985. V. 24. № 2. P. 1403.
11. Mahato S.B., Banerjee S., Podder S. // Ibid. 1989. V. 28. № 1. P. 7.
12. Holland H.L. // Chem. Soc. Reviews. 1982. V. 11. № 4. P. 371.

13. Bridgeman J.E., Browne J.W., Cherry P.C. et al. // Chem. Communns. 1969. P. 463.

14. Evans J.M., Jones E.R.H., Kasai A. et al. // Ibid. 1969. P. 1491.

15. Bridgeman J.E., Cherry P.C., Clegg A.S. et al. // J. Chem. Soc. Perk. Trans. I. 1970. P. 250.

16. Brigeman J.E., Cherry P.C., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Chem. Communns. 1997. P. 482.

17. Clegg A.S., Jones E.R.H., Meakins Q.D., Pinhey J.T. // Ibid. 1970. P. 1029.

18. Meakins G.D., Blunt J.W., Clark I.M. et. al. // J. Chem. Soc. Perk. Trans. I. 1971. № 6. P. 1136.

19. Bell A.M., Cherry P.C., Clark I.M. et. al. // Ibid. 1972. № 16. P. 2081.

20. Bell A.M., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1972. № 21. P. 2759.

21. Bell A.M., Browne J.W., Denny W.A., Jones E.R.H. // Ibid. 1972. № 23. P. 2930.

22. Browne J.W., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1973. № 14. P. 1493.

23. Chambers V.E.M., Denny W.A., Evans J.M. et. al. // Ibid. 1973. № 14. P. 1500.

24. Bell A.M., Clark I.M., Denny W.A. et. al. // Ibid. 1973. № 19. P. 2131.

25. Clegg A.S., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1973. № 19. P. 2137.

26. Bell A.M., Chambers V.E.M., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1974. № 2. P. 312.

27. Chambers V.E.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 1. P. 55.

28. Bell A.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 4. P. 357.

29. Evans J.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 14. P. 1356.

30. Chambers V.E.M., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1975. № 14. P. 1359.

31. Bell A.M., Boul A.D., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Ibid. 1975. № 14. P. 1364.

32. Jones E.R.H., Meakins G.D., Miners J.O. et. al. // Ibid. 1975. № 16. P. 1552.

33. Bell A.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 20. P. 2040.

34. Jones E.R.H., Meakins G.O., Miners J.D., Wilkins A.L. // Ibid. 1975. № 22. P. 2308.

35. Jones E.R.H., Meakins G.D., Miners J.O. et. al. // Ibid. 1976. № 17. P. 1842.

36. Bird G.C., Fredericks P.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Ibid. 1980. № 3. P. 750.

37. Denny W.A., Fredericks P.M., Ghilera I., Jones E.R.H. et. al. // J. Chem. Res. Syn. 1980. № 1. P. 20.

38. Пат. 1. 342. 583 Англия // С.А. 1972. V. 76. 125417.

39. Peterson D.H., Murray H.C. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 1871.

40. Mininger R.F., Wall M.E., Dworshac R.G., Jackson R.W. // Archiv. Biochem. Biophys. 1956. V. 60. P. 427.

41. Sato Y., Hayakawa S. // J. Org. Chem. 1961. V. 26. P. 4181.

42. Hayakawa S., Sato Y. // Ibid. 1962. V. 27. P. 704.

43. Sato Y., Hayakawa S. // Ibid. 1963. V. 28. P. 2739.

44. Hayakawa S., Sato Y. // Ibid. 1963. V. 28. P. 2742.

45. Sato Y., Hayakawa S. // Ibid. 1964. V. 29. P. 198.

46. Sato Y., Waters J.A., Kaneko H. // Ibid. 1964. V. 29. P. 3732.

47. Jaffer J.A., Blunden G., Crabb T.A. // Phytochemistry. 1983. V. 22 № 1. P. 304.

48. Kondo E., Mitsugi T. // J. Amer. Chem. Soc. 1966. V. 88. № 20. P. 4737.

49. Пат. 71. 39067 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 403.

50. Пат. 71. 39068 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 404.

51. Пат. 71. 40754 Япония // С.А. 1972. V. 76. 71013.

52. Пат. 72. 13716 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 405.

53. Пат. 3. 575810 США // РЖХим. 1972. 3Н453.

54. Пат. 2 602 769 США // С.А. 1952. V. 46. 8331.

55. Пат. 2 877 162 США // С.А. 1960. V. 54. 1625.

56. Valcavi U., Martelli P., Sironi U.C., Tedeschi S. // Il Farmaco. 1975. V. 30. № 6. P. 464.

57. Пат. 2 889 255 США // С.А. 1959. V. 53. 22098.

58. Пат. 2 985 563 США // С.А. 1961. V. 55. 23923.

59. Пат. 3 009 933 США // С.А. 1962. V. 57 3527.

60. Пат. 3 054 725 США // С.А. 1963. V. 58. 912.

61. Пат. 3 087 938 США // С.А. 1963. V. 59. 11625.

62. Пат. 3 013 945 США // С.А. 1962. V. 56. 11586.

63. Пат. 1 048 579 ФРГ // С.А. 1961. V. 55. 3656.

64. Пат. 1 102 733 ФРГ // С.А. 1962. V. 56. 8803.

65. Пат. 1 768 203 ФРГ // С.А. 1970. V. 73. 75656.

66. Пат. 2 876 170 США // С.А. 1959. V. 53. 16226.

67. Пат. 2 0643 ГДР // С.А. 1961. В. 55. 25156.

68. *Kieslich K., Schulz G.* // *Annalen*. 1969. V. 726. P. 152.

69. *Kahnt F.W., Meystre Ch., Neher R. et. al.* // *Experientia*. 1952. V. 8. P. 422.

70. *Dodson R.M., Goldkamp A.H., Muir R.D.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. V. 82. P. 4026.

71. *Defaye G., Luche M.J., Chambar E.M.* // *J. Steroids Biochem.* 1978. V. 9. P. 331.

72. *Meeks R.C., Meister P.D., Eppstein S.H. et. al.* // *Chem. and Ind.* 1958. № 13. P. 392.

73. Пат. 1 021 845 ФРГ // С.А. 1960. В. 54. 4686.

74. Пат. 2 981 659 США // С.А. 1961. В. 55. 18007.

75. *Tan L., Falardeau P.* // *J. Steroids. Biochem.* 1970. V. 1. P. 221.

76. *Shibahara M., Moody J.A., Smith L.L.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1970. V. 202. P. 172.

77. Пат. 2 833 792 США // С.А. 1958. В. 52. 20272.

78. *Jones E.R.H.* // *Pure Appl. Chem.* 1973. V. 33. P. 39.

79. *McGzindle R., Turnbull J.K., Anderson A.B.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1975. № 13. P. 1202.

80. *Marcano D., Giorgio J.F., Evans J.M. et. al.* // *J. Org. Chem.* 1978. V. 43. № 20. P. 3960.

81. *Marcano D., Giorgio J.F., Evans J.M. et. al.* // *Steroids*. 1983. V. 41. P. 1.

82. *Jankov R., Stefanovic M.* // *Glas. Hem. Drus. Beograd*. 1975. V. 39. № 9—10. P. 577.

83. *Jankov R., Stefanovic M.* // *Ibid.* 1975. V. 39. № 9—10. P. 591.

84. *Stefanovic M., Jankov R., Urošević G.* // *Bull. Acad. Serbesci et arts.* 1977. V. 60. № 16. P. 55.

85. *Jankov R., Urošević G., Stefanovic M.* // *Glas. Hem. Drus. Beograd*. 1977. V. 42. № 3. P. 237.

86. *Jankov R., Urošević G., Stefanovic M.* // *Ibid.* 1980. V. 45. № 11. P. 517.

87. *Jankov R., Soskic V., Stefanovic M.* // *Ibid.* 1982. V. 47. № 6. P. 241.

88. *Jankov R., Soskic V., Stefanovic M.* // *Ibid.* 1983. V. 48. № 4. P. 121.

89. *Crabb T.A., Dawson P.J., Williams R.O.* // *Tetrahedron Lett.* 1975. № 42. P. 3623.

90. *Crabb T.A., Saul J.A., Williams R.O.* // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* 1977. № 23. P. 2599.

91. *Crabb T.A., Dawson P.J., Williams R.O.* // *Ibid.* 1980. № 11. P. 2535.

92. *Crabb T.A., Saul J.A., Williams R.O.* // *Ibid.* 1981. № 4. P. 1041.

93. *Crabb T.A., Ratcliffe N.M.* // *J. Chem. Rec. Syn.* 1986. № 2. P. 48.

94. *Campbel S.A., Crabb T.A., Williams R.O.* // *Ibid.* 1986. № 6. P. 208.

95. *Crabb T.A., Ratcliffe M.M.* // *Ibid.* 1986. № 6. P. 1928.

96. *Crabb T.A., Ratcliffe M.M.* // *Ibid.* 1988. № 7. P. 207.

97. *Belić I., Gaberc-Porekar V., Sočić H., Žakeg M.* // *Z. Allg. microbiol.* 1982. V. 22. № 6. P. 359.

98. *Creenspan G., Rees R., Smith L.L., Alburn H.E.* // *J. Org. Chem.* 1965. V. 30. № 12. P. 4215.

99. Пат. 19658 ГДР // С.А. 1961. В. 55. 26361.

100. Пат. 1 067 020 ФРГ // С.А. 1961. В. 55. 7758.

101. *Schubert A., Heller K., Siebert R.* // *Tetrahedron* 1962. V. 18. P. 993.

102. *Schubert A., Siebert R.* // *Chem. Ber.* 1958. 91. № 9. S. 1856.

103. *Schubert A., Langbein G., Siebert R.* // *Ibid.* 1957. V. 90. № 11. S. 2576.

104. *Caspi E., Ramm P.J., Gain R.E.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1969. V. 91. № 14. P. 4012.

105. *Kieslich K., Wieglepp H.* // *Chem. Ber.* 1971. B. 104. № 1. S. 205.

106. *Cleve G., Hoyer G.A., Kieslich K., Wieglepp H.* // *Ibid.* 1972. B. 105. № 2. S. 658.

107. Герасимова М.Л., Гусарова Т.И., Рыжкова В.М. // Хим.-фарм. журн. 1986. № 10. С. 1259.

108. Пат. 3 033 749. США // С.А. 1953. В. 58. 4630.

109. *Neher R., Desaulles P., Vischer E.* *Helv. Chim. acta*. 1958. V. 41. P. 1667.

110. Пат. 3033 748. США // С.А. 1962. В. 57. 16712.

111. *Kenney H.E., Serota S., Weaver E.A., Wall M.E.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. V. 82. № 14. P. 3689.

112. *Eppstein S.H., Peterson D.H., Leigh H.M. et. al.* // *Ibid.* 1953. V. 75. № 2. P. 421.

113. Пат. 2 882 205 США // С.А. 1959. В. 53. 16226.

114. Пат. 2 875 134 США // С.А. 1959. В. 53. 16226.

115. *Pan S.C., Laskin A.I., Junta B. et. al.* // *Abstr. 148th Meeting Amer. Chem. Soc. Chicago.* 1964. P. 140.

116. Пат. 2 721 828 США // С.А. 1956. В. 50. 7891.

117. *Stefanovic M., Husinec S.J., Jankov R.M., Bralovic M.* // *Glas. Hem. Drus. Beograd*. 1981. V. 46. № 7. P. 319.

118. *Turuta A.M., Kamernitzky A.B., Voishvillo N.E. et. al.* // *Mendeleev Communs.* 1991. № 3. P. 113.

119. Войшвилло Н.Е., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Хим.-фарм. журн. 1992. № 2. С. 64.

120. Джлантиашвили Н.В., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1992. № 5. С. 1182.

121. Войшвилло Н.Е., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. В печати.

122. Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.М. и др. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1992. № 8. В печати.

123. Schubert A., Onken D., Siebert R., Heller K. // Chem. Ber. 1958. B. 91. S. 2549.

124. Пат. 3117144 США // С.А. 1964. V7 60. 11344g.

Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Дата поступления
6.05.1992 г.

MICROBIAL HYDROXYLATION OF 5α -H-STEROIDS

Turututa A.M., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V.

Literature data on the application of microorganisms for the hydroxylation of 5α -H-steroids mainly of 5α -H-androstane and 5α -H-pregnane series as well as of 5α -H-sapogenins have been summarized. The covered data attempt to present a clear idea on the effect of substituent position in the steroid molecule upon the direction of hydroxylation and the microbial enzymes activity in terms of the model substrate-enzyme interaction.

The bibliography includes 124 references.