

## Новые активные грибные биокатализаторы трансформации андрост-4-ен-3,17-диона и андроста-1,4-диен-3,17-диона

<sup>1</sup>Коллеров В.В., <sup>1</sup>Шутов А.А., <sup>2</sup>Казанцев А.В., <sup>1</sup>Донова М.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
[svkollerov@rambler.ru](mailto:svkollerov@rambler.ru)

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Микробиологическое окисление и деградация боковой цепи фитостероинов, эффективно катализируемое различными бактериальными штаммами, является хорошо устоявшимся методом производства так называемых первичных стероидов андростанового ряда: андрост-4-ен-3,17-диона (АД) и андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) (1). Однако, для получения соединений, обладающих биологической активностью необходима дальнейшая структурная модификация 3-оксостероидов андростанового ряда, требующая различных реакций, в первую очередь, регио- и стереоспецифического гидроксирования, крайне сложного к осуществлению с использованием традиционного химического синтеза. Лекарственные препараты на основе 11- и 14-гидроксированных производных широко используются в терапии многих заболеваний, связанных с воспалительными и аллергическими процессами,  $7\alpha/\beta$ -гидроксипроизводные АД и АДД могут служить ключевыми предшественниками в комбинированном химико-микробиологическом синтезе ценных желчных кислот из неживотных источников (2,3).

Среди большого разнообразия микроорганизмов, способных катализировать структурную модификацию стероидов, мицелиальные грибы представляют особый интерес, так как являются источником уникальных монооксигеназ и оксидоредуктаз, позволяющих осуществлять устойчивый и экологичный синтез ценных гидроксистероидов (4). Тем не менее, биокаталитический потенциал большей части микромицетов остается практически неизученным в отношении 3-оксостероидов андростанового ряда.

Целью настоящего исследования являлось изучение трансформационной активности мицелиальных грибов (ранее не исследованных для этих целей) в отношении АД и АДД с выделением и идентификацией основных продуктов трансформации и установлением метаболических путей конверсии стероидных субстратов в клетках наиболее активных грибных культур.

В ходе проведения работы, 45 предварительно отобранных грибных штаммов из отделов *Ascomycota* и *Zygomycota* была протестированы в отношении двух стероидных субстратов: АД и его 1(2)-дегидропроизводного, АДД. За исключением шести представителей родов *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Sordaria* и *Conidiobolus*, не способных к структурной модификации АД и АДД в заданных условиях и четырех штаммов *Acremonium domschii*, *Chaetomidium pilosum*, *Thielavia ovispora* и *Phycomyces blakesleeanus*, проявляющих биокаталитическую активность только в отношении АДД с накоплением метаболитов не идентифицированной структуры (из-за их малого количества и низкой селективности образования), остальные 35 штаммов активно трансформировали АД и АДД.

С использованием методов экстракции и колоночной хроматографии были выделены и очищены все основные продукты и интермедиаты биоконверсии стероидных субстратов активными грибными культурами и структуры соединений были идентифицированы с использованием ряда аналитических методов: ТСХ, ВЭЖХ, МС, <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопии. Среди метаболитов с установленной структурой были выявлены продукты гидроксирования по положению  $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $11\alpha$  и  $14\alpha$ ,  $17\beta$  - и 1,2-восстановленные производные, а также продукты реакции 1,2-дегидрирования.

Способность к образованию  $7\alpha$ -гидроксированных производных АД и АДД была показана для 12 представителей семейств *Mucoraceae*, *Hypocreaceae*, *Cunninghamellaceae* и *Pleosporaceae*. Максимальное проявление  $7\alpha$ -гидроксильной активности в отношении АД с

накоплением свыше 25% 7 $\alpha$ -ОН-АД отмечалось для культуры *Absidia coerulea*. Реакцию 7 $\beta$ -гидроксилирования в отношении АД или АДД катализировали семь штаммов, преимущественно аскомицетов, относящихся к родам *Acremonium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Absidia* и *Cunninghamella*. Наиболее активными биокатализаторами данной реакции являлись грибные культуры *Drechslera* sp. и *Gibberella zeae*, способные к накоплению свыше 40% 7 $\beta$ -гидроксипроизводных.

Проявление 11 $\alpha$ -гидроксилазной активности в отношении исследуемых 3-окостероидов андростанового ряда было отмечено для 9 представителей родов *Acremonium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Beauveria*, *Absidia*, *Cunninghamella* и *Mortierella*, а штамм *Beauveria bassiana* был отобран как наиболее активный биокатализатор 11 $\alpha$ -гидроксилирования с накоплением до 50% 11 $\alpha$ -ОН-АД из АД. Примечательно, что наличие С1-С2 двойной связи в структуре молекулы АДД затрудняло введение гидроксильной группы в положение 11 $\alpha$  исследуемым штаммом с выходом 11 $\alpha$ -ОН-АДД менее 30%.

14 $\alpha$ -Гидроксилирование АД было характерно для шести представителей родов *Drechslera*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Absidia* и *Cunninghamella* с максимальным проявлением 14 $\alpha$ -гидроксилазной активности штаммом *Drechslera* sp. Следует отметить, что ни один из 45 протестированных штаммов микромицетов не обладал способностью катализировать введение гидроксильной группы в положение 14 $\alpha$  молекулы АДД, указывая на то, что наличие С1-С2 двойной связи в структуре молекулы стероидного субстрата, по-видимому, препятствует введению гидроксильной группы в положение С14.

Помимо реакций гидроксилирования, для некоторых грибных штаммов, в частности, *Drechslera* sp., *Acremonium cereales*, *Doratomyces purpureofuscus* и *Fusarium merismoides* было характерно проявление 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназной активности (17 $\beta$ -ГСД) с возможностью накопления из АД и АДД тестостерона и дегидротестостерона, соответственно. Наибольшее проявление 17 $\beta$ -ГСД активности наблюдалось для клеток мицелия *Drechslera* sp. при инкубировании с АД, однако, реакция восстановления 17-кето группы сопровождалась активным 7 $\alpha$ -гидроксилированием с накоплением 7 $\alpha$ -ОН-тестостерона в качестве основного продукта биоконверсии (до 40%).

Таким образом, в ходе проведения работы были выявлены новые перспективные биокатализаторы 7 $\alpha/\beta$ -, 11 $\alpha$ - и 14 $\alpha$ -гидроксилирования, а также 17-кето восстановления стероидов андростанового ряда. Полученные данные расширяют представления о биоразнообразии стероид-трансформирующих мицелиальных грибов, дополняют сведения о влиянии структуры стероидного субстрата на позицию гидроксилирования и свидетельствуют о высоком потенциале выявленных грибных биокатализаторов в синтезе ключевых интермедиатов ценных лекарственных форм.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 18-14-00361).

#### Литература

1. Donova, M.V., Egorova, O.V. 2012. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94, 1423–1447.
2. Bolten, S.L., Clayton, R.A., Easton, A.M., Engel, L.C., Messing, D.M., Reitz, B., Walker, M.C., Wang, T. 2007. *Aspergillus ochraceus* 11 $\alpha$ -hydroxylase and oxidoreductase. US Patent 7238507 B2.
3. Wang, Y., Yue, Q., Zhao, Y., Qiu, S., Peng, Y., Li, J., Zhang, T., Hai, L., Guo, L., Wu, Y. 2016. First synthesis of 22-oxa-chenodeoxycholic acid analogue. *Steroids.* 110, 70–76.
4. Nassiri-Koopaei, N., Faramarzi, M.A. 2015. Recent developments in the fungal transformation of steroids. *Biocatal Biotransformation.* 33, 1–28.