

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет

На правах рукописи

ДРУЖИНИНА АННА ВИКТОРОВНА

**Применение полимеров в микробиологических трансформациях
стероидов**

03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Центре «Биоинженерия» Российской Академии Наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук
Наталья Евгеньевна Войшвилло
кандидат химических наук
Валентина Александровна Андриюшина

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Ирина Павловна Смирнова
доктор химических наук
Игорь Викторович Заварзин

Ведущая организация:

Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН

Защита диссертации состоится « 7 » декабря 2010 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, биологический факультет, ауд. М-1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « » _____ 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пискункова Н.Ф.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Стероиды – кортикостероиды, гестагены, андрогены и эстрогены благодаря своей уникальной биологической активности и широкому спектру действия нашли большое применение в медицинской практике в качестве противовоспалительных, противошоковых, антиаллергических, противоастматических, диуретических, анаболических, противораковых, гормональных, контрацептивных и других лекарственных средств.

Известно использование стероидных препаратов при лечении свыше 100 распространенных заболеваний. Роль этой группы лекарственных препаратов, спасших не одну человеческую жизнь, трудно переоценить, поэтому многие из них входят в список жизненно необходимых. Потребность в стероидных гормональных препаратах в мире с каждым годом возрастает в связи с ухудшением экологии и соответственно значительным ростом аллергических, онкологических и других заболеваний.

В России в конце 80-х – начале 90-х годов выпускалось порядка 20 субстанций стероидных гормонов в объеме ~ 4-5 тонн. Объем производства кортикостероидов, включавший 7 наименований, составлял ~ 1,5 тонны.

За последние 15 лет состояние дел в этой области в России резко ухудшилось. Производство стероидных субстанций практически прекращено, а заводы переориентированы на выпуск готовой лекарственной формы из импортных субстанций, что привело к зависимости России от поставок из-за рубежа и недоступности для потребителей жизненно необходимых препаратов из-за их дороговизны. Поэтому разработка синтеза стероидных препаратов из доступного отечественного сырья и отработка отдельных технологических стадий синтеза с учетом новейших достижений биотехнологии является чрезвычайно актуальной задачей. Следует отметить, что химический синтез стероидов вследствие сложности строения стероидной молекулы и ее полифункциональности многостадийен и очень сложен. Поэтому важная роль в синтезе стероидов, особенно в промышленном масштабе, отводится микробиологической трансформации, имеющей значительные преимущества в виде высокой селективности (при наличии соответствующих штаммов), сокращению количества стадий синтеза, простоты аппаратного оформления, отсутствия необходимости в дорогих реактивах и экологической чистоты микробиологических методов. Более того, такая трансформация стероидов как гидроксирование практически выполнима только с помощью микробных катализаторов.

Однако, несмотря на все достоинства ферментативных процессов, их использование затрудняет чрезвычайно низкая растворимость стероидных субстратов в водных средах, что особенно существенно при масштабировании процессов. Проблема решения высокой нагрузки стероидного субстрата

является чрезвычайно актуальной и наиболее сложной при решении вопросов синтеза стероидов в промышленном масштабе.

Для повышения растворимости и доступности для микробной клетки практически нерастворимых в воде стероидных субстратов используют ряд приемов: механическое измельчение кристаллов до микрочастиц, применение смешивающихся и не смешивающихся с водой органических растворителей, использование природных полимеров, таких как циклодекстрины, хитин или хитозан, или синтетических полимеров класса N-виниламида, например поливинилпирролидона (**ПВП**) и поливинилкапролактама (**ПВК**). Тем не менее, ни один из приведенных способов не является универсальным. Среди указанных выше методов наиболее перспективным является применение полимеров.

Поэтому представлялось актуальным проведение исследований по поиску среди синтетических и природных полимеров универсального солюбилизатора, эффективного для трансформаций стероидных соединений различной структуры, а также исследование его влияния на стероид трансформирующую активность как бактерий, так и грибов, и изучение условий проведения в его присутствии наиболее часто используемых в синтезе стероидов трансформаций, таких как 1,2-дегидрирование и гидроксילирование в различные положения стероидной молекулы.

Цель и задачи работы. Целью данной работы являлось исследование в области повышения эффективности практически значимых микробиологических трансформаций стероидов, таких как 1,2-дегидрирование и направленное гидроксילирование путем применения в реакциях синтетических и природных полимеров.

В связи с данной целью были поставлены следующие задачи:

- Определить зависимость солюбилизирующей активности полимеров от их химического строения и молекулярной массы, а также структуры трансформируемых стероидов.
- Определить оптимальную концентрацию полимеров, наиболее эффективных в процессах 1,2-дегидрирования бактериями и гидроксילирования грибами.
- Исследовать факторы регуляции процесса 1,2-дегидрирования в присутствии наиболее эффективного солюбилизатора. и определить оптимальные условия, обеспечивающие максимальный выход целевого продукта.
- Провести в присутствии лучшего полимера направленное гидроксילирование Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксистероидов ряда андростана и прегнана грибами с различной гидроксилазной активностью с целью выхода на новые биологически активные соединения.

Научная новизна работы.

Изучена зависимость способности к солюбилизации стероидов у 16 полимеров класса N-виниламидов и циклодекстринов от величины молекулярной массы, концентрации полимера, его химической структуры. В числе исследуемых полимеров 11 соединений ранее не применялись в

трансформациях стероидов, осуществляемых с помощью бактерий, и 16 соединений – для трансформаций, осуществляемых грибами.

Впервые для стероидных трансформаций, осуществляемых грибными культурами, применены полимеры класса N-виниламидов и химически модифицированные циклодекстрины (ХМД).

Показано, что метилированный (randomly) β -циклодекстрин (МЦД) эффективен как солубилизатор в процессах трансформации стероидных соединений различной структуры, осуществляемых как бактериями, так и грибами.

Впервые показана возможность увеличения нагрузки исследуемых стероидных субстратов в реакциях гидроксирования грибами от 0.5-2 до 10-20 г/л в присутствии МЦД.

Впервые показана возможность повторного использования МЦД (не менее 3 раз) без его регенерации в процессах трансформации стероидов, осуществляемых как бактериями, так и грибами.

Впервые показано наличие 7α -гидроксилазной активности у гриба *Curvularia lunata* в отношении Δ^5 - 3β -гидроксистероидов.

Методом лабораторной селекции при непосредственном участии автора получен новый штамм *C. lunata*, отличающийся высокой 7α -гидроксилазной активностью в отношении стероидных Δ^5 -олефинов. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-981.

Разработан способ направленного 7α -гидроксилирования Δ^5 - 3β -гидроксистероидов с помощью нового штамма *C. lunata* ВКПМ F-981. На способ 7α -гидроксилирования получен патент РФ № 2 377 309 (Бюлл. Изобр. №36 от 27.12.2009). Изобретение включено отделом экономики и статистики промышленной собственности ФИПС в базу «Перспективные изобретения».

С помощью нового штамма *C. lunata* получено 17 гидроксипроизводных Δ^4 -3-кето- и Δ^5 - 3β -гидроксистероидов ряда андростана и прегнана, среди которых 4 новых соединения.

Практическая значимость работы.

Проведена оптимизация процесса трансформации 17α -метилтестостерона (МТС) с использованием штамма *Pimelobacter simplex* ВКПМ Ас-1632 с высокой 1,2-дегидрогеназной активностью. На основании разработанной технологии предложен эффективный одностадийный метод 1,2-дегидрирования Δ^4 -3-кетостероидов при повышенной нагрузке субстрата (до 20 г/л) в водном растворе МЦД. 1,2-Дегидроаналоги, находящие широкое применение в медицине и ветеринарии получены практически с количественным выходом. Метод соответствует лабораторно-техническому уровню согласно испытаниям, проведенным в аппаратном зале Центра «Биоинженерия» РАН, на основании которых составлен акт о наработке 125 г. метандростенолона (МЕТА).

Разработан способ направленного 7α -гидроксилирования стероидов с помощью нового штамма *C. lunata* ВКПМ F-981, открывающего возможности получения новых биологически активных соединений с иммуностимулирующей, противораковой, радиопротекторной и антихолестеринемической активностью.

Использование β -циклодекстрина (ЦД) и его химически-модифицированных производных - МЦД и гидроксипропил-ЦД (ГПЦД) в процессе направленного 7α -гидроксилирования позволили не только увеличить нагрузку субстратов с 2 до 10 г/л, но и скорость реакции почти в 2 раза и поднять выход 7α -гидроксистероидов с 15 до 95%.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: на VI Международном Форуме «Биотехнология и современность» (2005, Санкт-Петербург), VII Международном форуме «Биотехнология и современность» (2006, Санкт-Петербург), I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» (2007, Пущино), XX зимней международной молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2008, Москва), XXVIII Российской Школе «Наука и технология» (2008, Миасс).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 2 патента РФ, 1 сообщение и 5 тезисов.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, приложения. Работа содержит 115 страниц машинописного текста, 13 таблиц, 34 рисунка. Библиография включает 153 наименований, из них 123 иностранные работы.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, использованные в работе. В работе использовали штаммы бактерий и плесневых грибов ВКПМ *Pimelobacter simplex* Ac-1632, *Rhodococcus erythropolis* Ac-1740, *Curvularia lunata* F-981, а также *Corynebacterium simplex*, *Alternaria alternata*, *Beauveria sp.*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus nigricans* из рабочей коллекции лаборатории «Биотехнология стероидов» Центра «Биоинженерия» РАН.

Исследуемые микроорганизмы хранили при 4°C, бактерии - на скошенном кукурузно-глюкозном агаре, грибы - на средах, описанных в литературе. Процессы выращивания биомассы и трансформации стероидов проводили при 28°C на круговой качалке при скорости перемешивания 220 об/мин. Культуры выращивали в конических колбах 750 мл со 100 мл среды. Через 6-8 ч роста бактерий *P. simplex* в среду добавляли ацетат кортизона. Через сутки культивирования клетки бактерии отделяли центрифугированием при 3000 g, 4°C и дважды отмывали охлажденным стерильным физиологическим раствором. Полученную биомассу распределяли равными порциями в пробирки и замораживали при 20°C.

Трансформации стероидов бактериями в неростовых условиях проводили отмытыми от среды клетками в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих деминерализованную воду, если не сказано иначе. Стероидный

субстрат в количестве 5 г/л вносили в виде раствора в метиловом спирте в комплексе с 2% CaCl₂ и солибилизировали с помощью ЦД, ХМЦ, ПВК, поливинилпирролидона (ПВП), полиэтиленоксидов (ПЭО), поливиниловых спиртов (ПВС). Биоконверсию стероидов в ростовых условиях осуществляли на кукурузно-глюкозной среде, содержащей стероид и МЦД в мольном соотношении 1:1. Стероидный субстрат вносили в среду в диметилформамиде (ДМФА), количество которого в среде не превышало 2%.

Трансформацию стероидов грибными культурами в ростовых условиях проводили в конических колбах объемом 750 мл в 100 мл среды. Биоконверсию с помощью мицелия, отделенного от питательной среды, осуществляли в фосфатном буфере, рН 6.0-6.3 в тех же условиях. В трансформационную среду стероид вносили следующими способами: как суспензию микрочастиц размером до 5-15 мкм; в виде комплексов с МЦД, с ПВК или ПВП; в растворе ДМФА.

Анализ продуктов трансформации осуществляли с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ, ПМР. Для ТСХ использовали пластинки Silufol UV 254 (Чехословакия) и Sorbifil (Россия). Аликвоты культуральной жидкости (1-2 мл) отбирали с интервалом, определяемым целями эксперимента. Экстракцию стероидов осуществляли 5-кратным объемом этилового эфира уксусной кислоты. Разделение стероидных соединений проводили в системах растворителей: хлороформ/метанол (8:1) для продуктов 1,2-дегидрирования и ацетон/хлороформ (7:3) для продуктов гидроксилирования. Визуальную оценку продуктов биоконверсии проводили на хроматоскопе. Для оценки содержания 5-олефинов, хроматографические пластинки проявляли 1%-ным раствором ванилина в 10%-ной хлорной кислоте с последующим нагреванием до появления окрашенных пятен.

Содержание Δ^4 -3-кетостероидов в среде определяли с помощью ВЭЖХ. Содержание Δ^5 -3-гидроксистероидов - с помощью ПМР. Выход гидроксипродуктов определяли соотношением выделенного кристаллического продукта в % от теоретического количества.

Для ВЭЖХ использовали колонки «Нуклеосил C₁₈» 250 x 4.6 мм. Подвижная фаза – смесь 70% метанола с 30% воды, подкисленной концентрированной ортофосфорной кислотой (1 мл кислоты на 1 л воды). Скорость подвижной фазы – 1.2 мл/мин.

Спектры ПМР снимали на ПМР-спектрометре XL-400 («Varian»США) в CDCl₃ или в смеси CDCl₃ и D-DMSO.

Все эксперименты проведены три раза в трех повторностях. Результаты представлены усредненными значениями. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью Excel (MS Office 2007).

2.2 ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. 1,2 – Дегидрирование стероидных субстратов.

При сравнении способности бактерий *C. simplex*, *R. erythropolis* и *P. simplex* вводить 1,2-двойную связь в 17 α -метилтестостерон (МТС) было установлено, что штамм *P. simplex* проявил максимальную 1,2-дегидрирующую активность в отношении МТС. При нагрузке МТС 1 г/л до 80% субстрата

штамм превращал его в целевой продукт – МЕТА, токсичный для бактерий в концентрации выше 1 г/л. С целью повышения концентрации стероидов, нерастворимых в водных средах, и увеличения их доступности для бактериальной клетки, изучали интенсивность процесса 1,2-дегидрирования МТС с помощью *P. simplex* в присутствии полимеров синтетического и природного происхождения.

2.2.1.1. 1,2-дегидрирование МТС в присутствии ПВК. Согласно данным табл. 1, стероид трансформирующая активность бактерии и конверсия МТС при нагрузке 4 г/л в присутствии низкомолекулярных ПВК были минимальными. Небольшой положительный эффект имел место при использовании высоко молекулярных ПВК (мол. масса не менее 500 кДа). Однако стероид трансформирующая активность клеток по отношению к МТС при этом была лишь сравнима с контролем (без солюбилизатора).

Таблица 1. 1,2-дегидрогеназная активность *P. simplex* по отношению к МТС, солюбилизованному с помощью ПВК

М.м. полимера, кДа	Концентрация полимера, %	Активность клеток, мкмоль/мин/мг Кл	Конверсия МТС*, %
3	5.0	0.2	9-10
15	5.0	0.5	30-35
500	1.0	4.5	55-60
-«-	4.0	5.1	65-68
-«-	6.0	6.5	70-75
-«-	10.0	8.2	80-88
900 тыс.	0.6	4.1	40-42
-«-	1.0	4.8	40-45
-«-	2.5	4.9	52-56
-«-	4.0	5.3	58-60
-«-	6.0	6.1	70-74
-«-	10.0	7.8	90-92
контроль	-	5.6-5.9	80-82

* – Продолжительность трансформации 70 ч., биомасса 1.2 г/л

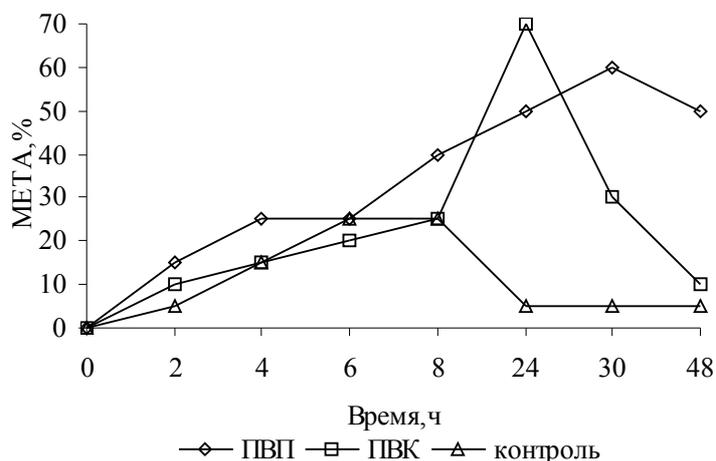


Рис. 1. Скорость накопления МЕТА в присутствии 1 % ПВП и ПВК (М.м. = 2000 кДа)

До 70% МЕТА образовывалось при использовании ПВК с молек. массой 2000 кДа, но при концентрации полимера не выше 1.5% (рис. 1). Следует заметить, что и в контроле и в большинстве опытов с ПВК, конверсия МТС была высокой 80-90% (табл. 1), но во всех вариантах 1,2-дегидрирование сопровождалось деструкцией образующегося МЕТА при увеличении времени трансформации.

2.2.1.2. Трансформация МТС с помощью ПВС.

Из данных табл. 2 следует, что добавление в реакционную среду гидрофильных ПВС существенно уменьшает стероид трансформирующую активность клеток.

Таблица 2. 1,2-Дегидрогеназная активность *P. simplex* по отношению к МТС, солюбилизованному с помощью ПВС

М.м. полимера, кДа	Концентрация полимера, %	Активность клеток мкмоль/мин/мг Кл	Конверсия МТС, 72ч, %
10	0.5	4.2	65
-«-	1.0	2.1	55
-«-	3.0	2.5	50
-«-	4.0	2.5	45
-«-	6.0	2.1	40
53	5.0	1.5	28
контроль	-	5.2	85

Скорость конверсии МТС уменьшалась при увеличении как содержания ПВС, так и молекулярной массы полимера. Низкая скорость трансформации МТС в присутствии ПВС 53 кДа сохранялась также при увеличении плотности биомассы в 2 раза, при этом выход МЕТА составил не более 30%.

2.2.1.3. 1,2-дегидрирование МТС в присутствии ПВП.

ПВП были активными солюбилизаторами МЕТА. Стероид трансформирующая активность клеток была выше контрольного значения при использовании как низкомолекулярных ПВП, так и ПВП с молекулярной массой 500 кДа в концентрации 0.5-5.0% при плотности биомассы 1.5 г/л (табл. 3).

При солюбилизации МТС с помощью ПВП 500 кДа (в концентрации 3.5%) и увеличении плотности биомассы до 4 г/л содержание МЕТА достигало 70% за 8 ч трансформации (рис. 2). При более высоком содержании полимера в среде (10%) резко ухудшался режим аэрации и выход МЕТА составлял не более 20%. ПВП с молекулярной массой 2000 кДа был применим только в количестве не более 1.5%. Деструкция продукта в присутствии ПВП также имела место, но она протекала менее интенсивно, чем при солюбилизации МТС с помощью ПВК (рис. 2).

Таблица 3. 1,2-Дегидрогеназная активность *P. simplex* по отношению к МТС, солюбилизованному с помощью ПВП (плотность биомассы 1.5 г/л)

М.м. полимера, кДа	Концентрация полимера, %	Активность клеток мкмоль/мин/мг Кл	Конверсия МТС, %	Время, ч
10				
-«-	0.5	6.8	80-85	72
-«-	1.0	6.9	80-82	72
-«-	2.0	7.2	85-90	72
-«-	4.0	7.1	85-95	72
-«-	5.0	6.9	80-90	48
500				
-«-	0.5	6.5	80-85	50
-«-	4.0	9.2	90-96	48
-«-	5.0	7.8	70	72
контроль	-	5.1	80-85	72

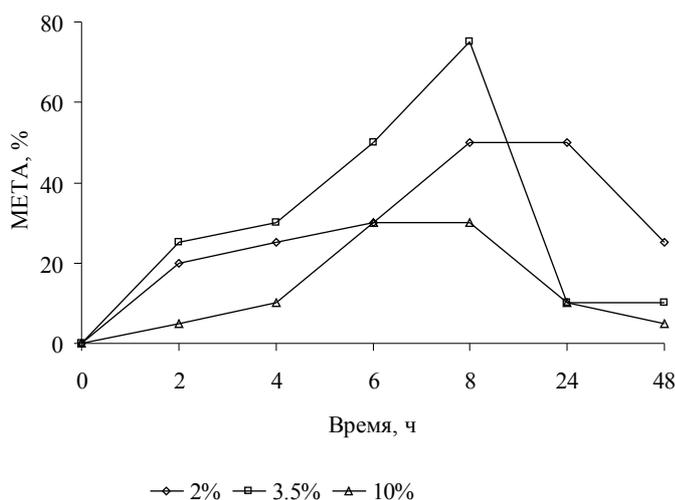


Рис. 2. Накопление МЕТА в зависимости от концентрации (в %) ПВП (М.м.= 500 кДа), нагрузка МТС 4 г/л, плотность биомассы 4 г/л.

2.2.1.4. Трансформация МТС в присутствии ПЭО.

Для солюбилизации 5 г/л МТС использовали ПЭО с молекулярной массой 20 кДа и 200 кДа, взятые в весовом соотношении МТС/ПЭО 1:5. При солюбилизации МТС с помощью ПЭО с М.м. 200 кДа отмечалась деструкция стероидов, а выход МЕТА составил не более 30% (в контроле - 10-20%). Однако, при использовании ПЭО с М.м. 20 кДа деструкции стероидов не наблюдалось, а содержание МЕТА составляло 50%.

2.2.1.5. Трансформация МТС в присутствии химически модифицированных циклодекстринов

С целью активизации процесса 1,2-дегидрирования было предпринято изучение биоконверсии МТС в присутствии ЦД (контроль), МЦД, ГПЦД и гидроксиэтил-ЦД (ГЭЦД). Содержание МТС в реакционной смеси составляло 5 г/л, мольное соотношение стероид/ЦД – 1:1. Плотность биомассы – 4 г/л.

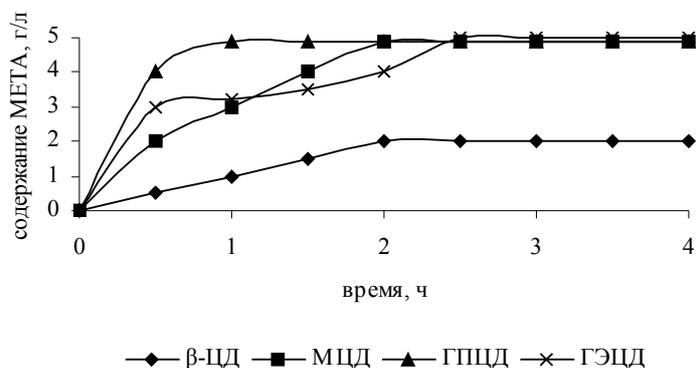


Рис. 3. Накопление МЕТА в зависимости от модификации ЦД

Как видно из рис. 3, в случае использования ХМЦ полное превращение МТС в МЕТА происходило в течение 1.5-2.5 ч, тогда как при солюбилизации МТС с помощью ЦД образовывалось не более 40% МЕТА. При этом не происходило восстановления 1,2-двойной связи и не наблюдалась деструкция стероидов. Этим ХМЦ, используемые в качестве солюбилизаторов МТС, существенно отличались от исследованных ранее синтетических полимеров - ПВК и ПВП, при которых, во-первых, минимальное время трансформации 4 г/л МТС в МЕТА было не менее 8 ч и, во-вторых, при достижении определенного количества МЕТА начиналась деструкция продукта реакции.

Максимальная скорость накопления МТС наблюдалась при использовании ГПЦД. Однако для дальнейших исследований был выбран МЦД, как достаточно эффективный и более экономичный солюбилизатор.

2.2.1.5.1 Оптимизация 1,2-дегидрирования МТС штаммом *P. simplex* в присутствии МЦД.

Влияние индуктора на 1,2-дегидрогеназную активность отмытых клеток *P. simplex*. Как видно из рис. 4, время, необходимое для полной трансформации 5 г/л МТС в МЕТА было существенно меньше в случае использования индуктора (ацетат кортизона).

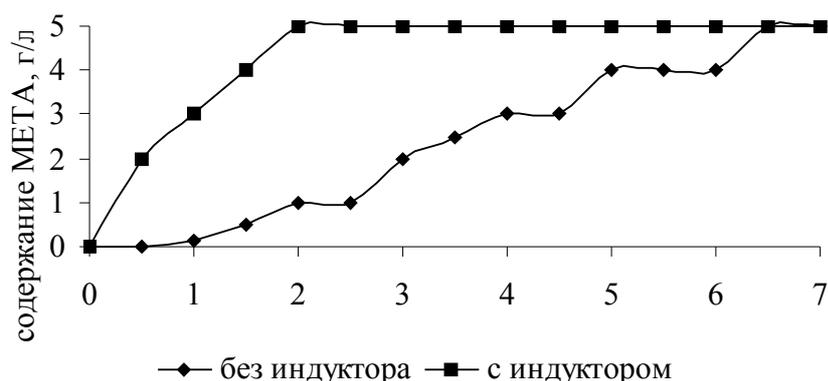


Рис. 4. Влияние индуктора на процесс 1,2-дегидрирования МТС.

Полученные данные говорят о присутствии небольших количеств конститутивного фермента в клетках *P. simplex*. Внесение в растущую культуру *P. simplex* ацетата кортизона резко увеличивало активность 3-КСД.

Трансформация МТС растущими и отмытыми клетками *P. simplex*. Как видно из рис. 5, биоконверсия МТС в МЕТА в присутствии МЦД отмытыми клетками (нагрузка 5 г/л) была более эффективна, чем растущей культурой

(нагрузка 2 г/л). При этом на 16 час трансформации наблюдалась полная конверсия МТС в МЕТА в то время как при трансформации растущей культурой содержание МЕТА составляло 60% при остаточном МТС- 30%.

Через 24 ч в культуральной жидкости обнаруживается лишь 30% МЕТА, что связано с разрушением стероидного субстрата и использованием клетками в качестве источника углерода как стероидов, так, возможно, и самого МЦД.

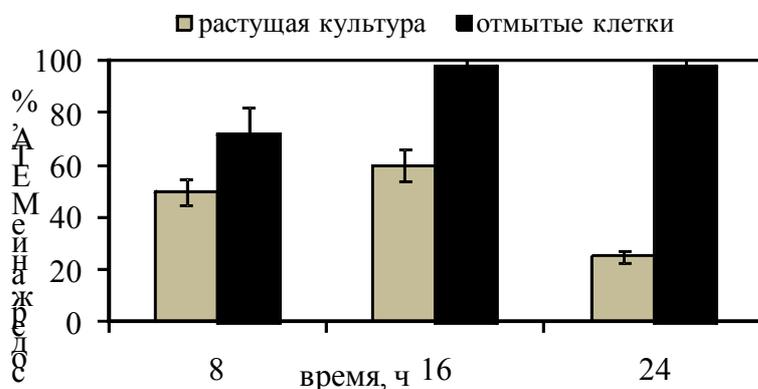


Рис. 5. Трансформация МТС в МЕТА растущей культурой и отмытыми клетками *P. simplex*

Влияние количества биомассы *P. simplex* на скорость 1,2-дегидрирования МТС. При использовании биомассы в количестве 2-8 г/л полная конверсия 5 г/л МТС проходила за 1.5-3.5 ч. Продолжительность конверсии МТС с помощью биомассы в количестве 1.0 г/л возрастала до 6.5 ч, причем полного его превращения в МЕТА не происходило (рис. 6).

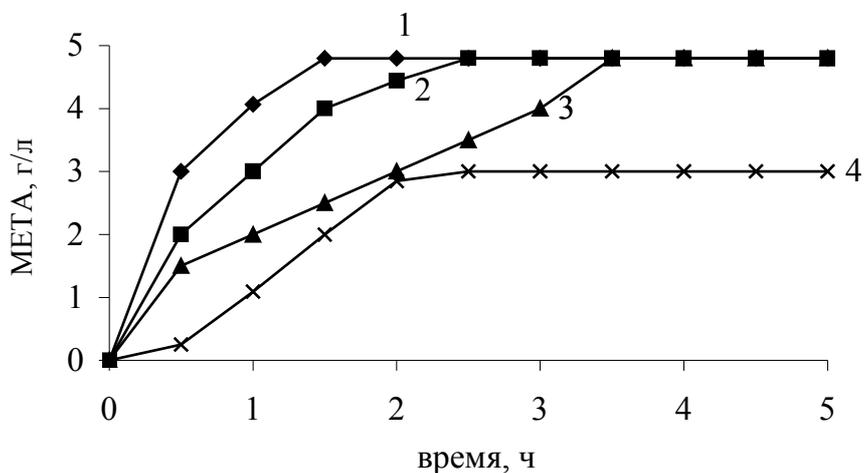


Рис. 6. Влияние количества биомассы (г/л) отмытых от среды клеток *P. simplex* на образование МЕТА при трансформации МТС: 1 – биомасса 8 г/л, 2 – биомасса 4 г/л, 3 – биомасса 2 г/л, 4 – биомасса 1 г/л (сухой вес).

Влияние состава трансформационной среды. Как видно из рис. 7, величина ионной силы используемого раствора имеет существенное значение. Начальная скорость трансформации МТС, растворенного в воде, была несколько выше по сравнению со скоростью превращения МТС в солевых растворах. В свою очередь, начальная скорость трансформации МТС в растворе с меньшим содержанием солей - 7 г/л (физиологический раствор) была выше, чем в фосфатном буфере (11 г/л).

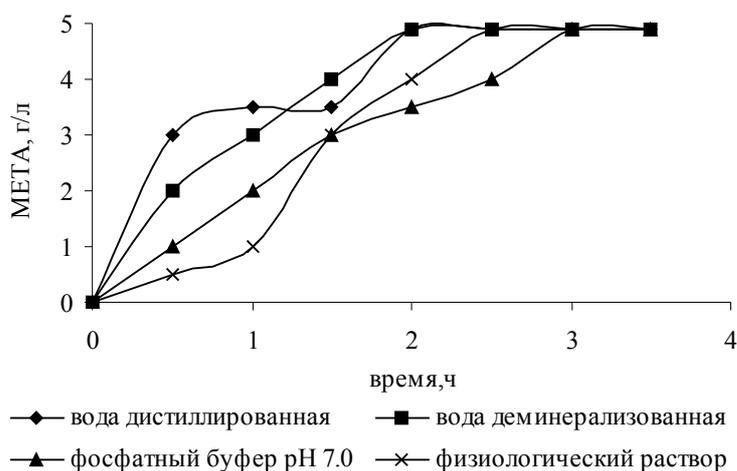


Рис. 7. Влияние состава трансформационной среды на конверсию 5 г/л МТС в МЕТА.

Влияние pH на скорость 1,2-дегидрирования МТС. Клетки *P. simplex* проявляли активность 3-КСД в широком интервале pH (5-8.5) (табл. 4). В кислой среде (pH 5.2) скорость процесса снижалась относительно нейтральных значений pH, время полной трансформации составило 4.5 ч и 2.5 ч соответственно. Скорость трансформации МТС незначительно снижалась при щелочном значении pH, при этом время, необходимое для полного превращения субстрата, составило 3 ч.

Таблица 4. Влияние pH буферной среды на стероид трансформирующую активность отмытых клеток *P. simplex* (содержание исходного МТС – 5 г/л).

PH буферной среды	Время полной конверсии МТС в МЕТА, ч	Активность отмытых клеток, нмоль/мин x мг
5.2	4.5	15.7
7.0	3.0	23.6
8.5	3.5	20.2

Влияние количества растворителя на конверсию МТС в МЕТА. Как видно из рис. 8, с увеличением концентрации вносимого растворителя, наблюдалось снижение скорости процесса. Так, если при концентрации метилового спирта 5% время полной конверсии МТС составило 3.5 ч, то при 7% увеличилось до 4.5 ч. При увеличении содержания в среде метанола до 10% полная конверсия МТС в МЕТА не была достигнута в течение 7 часов инкубации.

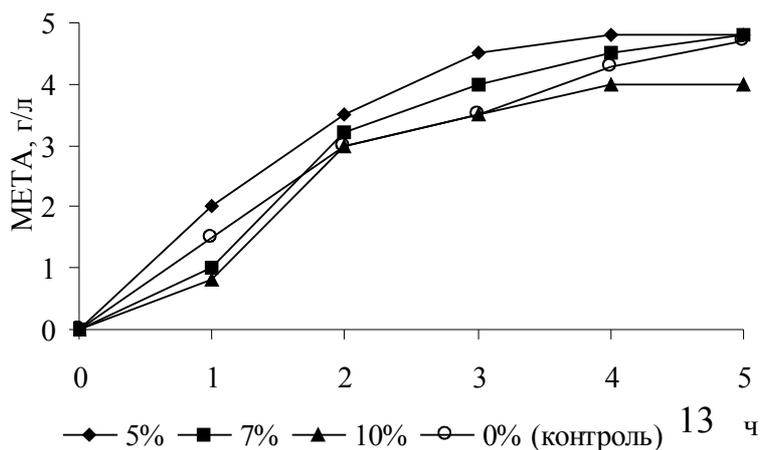


Рис. 8. Влияние метанола (%) на скорость образования МЕТА при конверсии МТС, солюбилизированного Ме-ЦД.

Влияние концентрации стероидного субстрата на скорость процесса 1,2-дегидрирования МТС. Исходя из полученных результатов экспериментов по оптимизации условий трансформации МТС, представлялось возможным увеличение концентрации стероидного субстрата. С увеличением нагрузки МТС снижалась скорость процесса 1,2-дегидрирования. Время полной конверсии МТС при исходном содержании стероидного субстрата 5, 7 и 10 г/л составило 2, 3.5 и 4.5 ч. соответственно.

В подобранных оптимальных условиях трансформации (МЦД, деионизированная вода, 28°C, биомасса *P. simplex* 4 г/л, концентрация метанола - 7%) с нагрузкой МТС 20 г/л полная конверсия субстрата наблюдалась через 15 ч без образования побочных продуктов и МЕТА был выделен с выходом 90%. В аналогичных условиях при использовании ГПЦД время трансформации сократилось до 4,5 ч.

Повторное использование МЦД в качестве солюбилизатора. Было показано, что трансформация с повторным использованием МЦД отличалась от контроля только скоростью образования МЕТА, который и в 1, и во 2 цикле был получен с количественным выходом. Конверсия МТС в 3 цикле была не полной. МЕТА был получен с выходом не более 80%. Мы предполагаем, что трансформация в 3 цикле тормозится накоплением этилацетата в полимере.

2.2.1.6. 1,2-Дегидрирование андростендиона и гемисукцината тестостерона

Используя оптимальные условия биоконверсии МТС с помощью *P. simplex* проводили трансформацию андростендиона (АД) при нагрузке 20 г/л и гемисукцината тестостерона при нагрузке 10 г/л при мольном соотношении МЦД/стероид 1.5/1 и 1.7/1 соответственно. 1,2-Дегидроаналоги этих соединений были получены с количественным выходом через 3.5-4 ч трансформации. В отсутствие МЦД биоконверсия указанных стероидов в виде микрокристаллов не происходила.

2.2.2. Гидроксилирование

Изучали влияние полимеров на процессы гидроксилирования Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксистероидов на примере АД и ацетата дегидроэпиандростерона (АДЭА) и грибами *A. alternata*, *Beauveria sp.*, *B. sorokiniana*, *C. lunata*, *Fusarium sp.*, *R. nigricans*, выбранными на основании литературных данных об их способности к трансформации стероидов.

2.2.2.1. 11 α -Гидроксилирование АД

Трансформация андростендиона мицелием *Beauveria sp.* Известно, что *Beauveria sp.* проявляет по отношению к АД как 11 α -гидроксилазную активность, так и активность 17 β -оксистероиддегидрогеназы (ОСД) (рис.9).

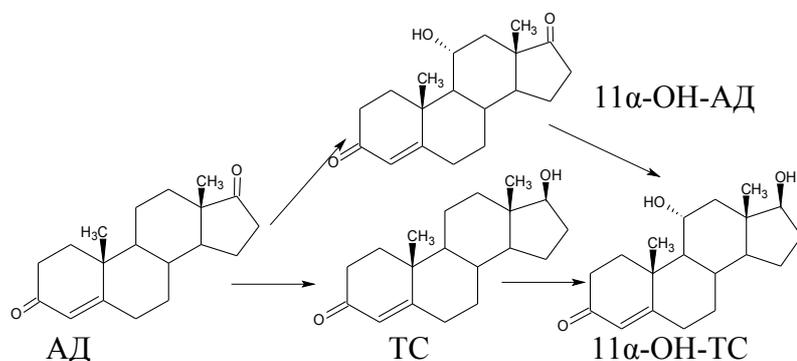


Рис. 9. Трансформация АД культурой *Beauveria sp.*

Но соотношение образующихся продуктов существенно зависело от способа внесения АД. Даже при минимальном содержании АД 1 г/л, внесенным в среду в виде 1%-ного раствора в ДМФА, одновременно с 11 α -гидроксилированием протекало восстановление 17-кетогруппы и в качестве единственного продукта получено 35% 11 α -гидрокситестостерона вместо 11 α -гидрокси-АД (табл.5).

При увеличении количества трансформируемого АД до 4 г/л и соответственно ДМФА до 3.5%, наблюдалось полное ингибирование 11 α -гидроксилазной активности гриба и значительное подавление ОСД. Полная конверсия АД имела место только при использовании МЦД.

Таблица 5. Трансформация АД мицелием *Beauveria sp.* (биомасса 8 г/л)

Нагрузка АД, г/л	Способ внесения АД	Время трансформации, ч	Стероиды в реакционной смеси, %			
			АД	11 α -ОН-АД	ТС	11 α -ОН-ТС
1	ДМФА	48	60	-	-	35
1	микрористаллы	30	20	-	35	40
1	МЦД	20	0	0	-	60
4	ДМФА	30	85	-	10	-
4	микрористаллы	30	60	5	-	30
4	МЦД	46	45	-	45	3
4	МЦД*	30	0	-	70	20

*-биомасса 17 г/л

Наилучшим вариантом оказался способ внесения АД в виде комплекса с МЦД, который позволил разграничить стадии восстановления и 11 α -гидроксилирования и ускорить процесс. При увеличении количества используемого мицелия вдвое, скорость и степень биоконверсии АД увеличивались почти в два раза, основным продуктом являлся ТС, который получен с содержанием 70% (Табл. 5).

2.2.2.2. 14 α -Гидроксилирование

Трансформация АД стероидов мицелием *S. lunata* ВКПМ F-981 в присутствии ПВП. Изучали влияние ПВП с молекулярной массой 500 и 2000 кДа на процесс трансформации АД в 14 α -гидрокси-АД. Из табл. 6 видно, что

при использовании ПВП с молекулярной массой 500 кДа и 2000кДа, содержание 14 α -гидрокси-АД было лишь незначительно выше, чем в контроле. Более низкая по сравнению с контролем степень деструкции и гидроксилирования стероидов может быть связана с образованием прочного комплекса стероидов с полимером, недоступного для ферментных систем клетки.

Таблица 6. Трансформация АД мицелием *S. lunata* с помощью ПВП.

Молекулярная масса ПВП, кДа	Стероиды в реакционной смеси, %	
	АД	14 α -ОН-АД
500	50	20
2000	45	25
Контроль	10	15

Трансформация АД в виде комплекса с ХМЦ. Для солюбилизации АД использовали МЦД и ГПЦД в мольном соотношении АД/ЦД 1:1 (весовое 1:5). При трансформации АД, солюбилизированного с помощью ГПЦД, мицелием *S. lunata* ВКПМ F-981 степень конверсии достигала лишь 35% (табл. 7).

Таблица 7. Трансформация 4 г/л АД мицелием *S. lunata* в присутствии ХМЦ

Солюбилизатор	Время трансформации, ч	Конверсия АД, %	Содержание 14 α -ОН-АД, %
МЦД	20	80	75
ГПЦД	22	35	40
Контроль	17	20	20

При этом наблюдалось увеличение содержания побочных продуктов по сравнению с контролем. В отличие от ГПЦД, при использовании МЦД содержание 14 α -гидрокси-АД в трансформационной среде через 20 ч составляло не менее 70%. При этом целевой продукт был выделен с выходом 55-60% (Табл. 7).

Подбиралось оптимальное количество МЦД, необходимое и достаточное для успешной трансформации. Показано, что весовое соотношение АД/МЦД может быть уменьшено до 1:4. В то время как при меньших соотношениях снижались скорость трансформации и степень биоконверсии АД. (Рис. 10)

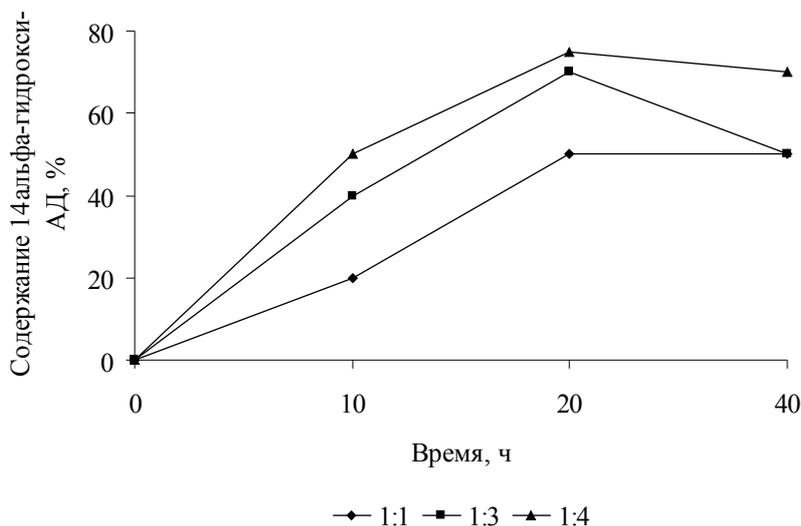


Рис. 10. Накопление 14 α -гидрокси-АД при различных соотношениях АД/МЦД (нагрузка 4 г/л)

Изучалась возможность повторного использования МЦД. С этой целью водная фаза после отделения мицелия и экстракции продуктов трансформации была использована для проведения 3 повторных циклов трансформаций. Все три цикла осуществлялись с использованием свежего мицелия, без регенерации и добавления новой порции МЦД. При нагрузках АД в 4 г/л период его полной конверсии в 14 α -гидрокси-АД составлял 24 ч, а содержание 14 α -гидрокси-АД в водной фазе второго и третьего циклах - 70%. В 4-ом цикле гидроксилазная активность мицелия была низкой.

Трансформация 9 α -гидрокси-АД и андростадиендиона (АДД).

Установлено, что кроме АД *S. lunata* вводит 14 α -гидроксигруппу так же в 9 α -гидрокси-АД и АДД. Однако трансформация 9 α -гидрокси-АД в виде комплекса с МЦД протекала, в отличие от АД, с более низким выходом целевого 14 α -гидроксипроизводного, по сравнению с тем, какой получали при трансформации кристаллического субстрата (табл. 8). В отсутствие МЦД 9 α -гидрокси-АД при нагрузке 0.5-2.0 г/л был полностью конвертирован в 9 α ,14 α -дигидрокси-АД, выделенного с выходом 70-85%. Трансформация 9 α -гидрокси-АД в количестве 2 г/л в комплексе с МЦД характеризовалась образованием 9 α ,14 α -дигидрокси-АД в небольшом количестве и появлением не идентифицированных продуктов.

Таблица 8. Продукты гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов ряда андростана и прегнана мицелием *S. lunata*, образуемые в присутствии МЦД и в отсутствие солюбилизатора (контроль).

Стероидный субстрат	Нагрузка, г/л	Основные продукты трансформации	Содержание основных продуктов, %	
			МЦД	Контроль
ТС	4.0	11 β -гидрокси-ТС	75	35
АД	4.0	14 α -гидрокси-АД	70	20
9 α -ОН-АД	2.0	9 α ,14 α -дигидрокси-АД	10	80
АДД	4.0	1,2-дегидро-ТС	45	75
		14 α -гидрокси-АДД	45	10
Δ^4 ПГ	2.0	6 α -гидрокси- Δ^4 ПГ	30	10
		11 β -гидрокси- Δ^4 ПГ	30	10
В-во «S»	10.0	В-во «F»	65	55
		14 α -гидрокси-«S»	30	40
ГМПД	4.0	11 β -гидрокси-ГМПД	50	-
		7 β -гидрокси-ГМПД	30	-
		7 β ,11 β -дигидрокси-ГМПД	-	15

Трансформации АДД (4 г/л) как в отсутствие МЦД, так и в его присутствии, предшествовала удлиненная лаг-фаза, процесс трансформации протекал с образованием 1,2-дегидро-ТС и 14 α -гидрокси-АДД соответственно в отношении 7:1 и 1:1 (табл. 8).

2.2.2.3. 11 β -Гидроксилирование стероидов мицелием *Curvularia lunata* ВКПМ F-981. В отличие от гидроксилирования 17-кетостероидов андростанового ряда (АД, АДД, 9 α -гидрокси-АД), мицелий *C. lunata* вводил гидроксигруппу в 17-гидроксиандростен – ТС в положение 11 β . Аналогично, в 11 β -положение протекало гидроксилирование прегнановых стероидов – прогестерон (Δ^4 ПГ), вещества «S» Рейхштейна (в-во «S»), 20-гидроксиметилпрегна-1,4-диен-3-она (ГМПД), основными продуктами трансформации которых являлись 11 β -гидроксипроизводные – исходные соединения в синтезе некоторых лекарственных препаратов стероидной природы. В случае 11 β -гидроксилирования указанных соединений МЦД также оказался эффективным солюбилизатором (табл. 8). Следует отметить, что новые продукты трансформации ГМПД (11 β -гидрокси-ГМПД и 7 β -гидрокси-ГМПД) получены только в присутствии МЦД (табл. 8).

Трансформация ТС. 11 β -Гидроксилирование ТС проводили при нагрузке 4 г/л. В присутствии МЦД конверсия ТС в 11 β -гидрокси-ТС протекала без накопления побочных продуктов и заканчивалась за 24 ч. За это время в реакционной жидкости образовалось до 75% 11 β -гидрокси-ТС, тогда как без солюбилизатора накопилось только 35% продукта (табл. 9), после чего началась его деструкция. При трансформации ТС, Δ^4 ПГ, ГМПД в присутствии МЦД деструкция отсутствовала.

Трансформация в-ва «S». Также без деструкции стероидов происходило введение 11 β -гидроксигруппы в в-во «S», конвертируемое в виде комплекса с МЦД в отношении 1:1 (моль/моль) при концентрации до 10 г/л в течение 22 ч, тогда как в контроле без МЦД – в течение 46ч (табл. 9). Следует отметить, что в присутствии МЦД на мицелии отсутствовали продукты трансформации, что значительно упрощало выделение чистого гидрокортизона из водной фазы (табл. 9). Также следует подчеркнуть, что в присутствии МЦД трансформация протекала с образованием меньшего количества побочного 14 α -гидроксипроизводного в-ва «S».

Таблица 9. Трансформация кортексолона с помощью мицелия *C. lunata* ВКПМ F-988 при нагрузке 10 г/л.

Наличие МЦД	Время трансформации, ч	Общее содержание продуктов трансформации, %		Выход кристаллического гидрокортизона, %
		в водной фазе	в мицелии	
-	46	48.8	42.6	43.2
+	22	91.5	следы	58.0

2.2.2.4. 7 α -гидроксилирование стероидов

Гидроксилирование стероидных 5-олефинов проводили грибами *A. alternata*, *B. sorokiniana*, *C. lunata*, *Fusarium sp.*, *Rh. nigricans*. Исследуемые грибы проявили низкую степень конверсии АДЭА даже при низкой нагрузке стероидного субстрата (0.5 г/л), за исключением *C. lunata*, который был выбран для дальнейших исследований (табл. 10).

Таблица 10. Трансформация АДЭА различными грибами

Микроорганизм	Нагрузка АДЭА, г/л	Время, ч	Конверсия АДЭА, %	Содержание 7 α -ОН-ДЭА в реакционной смеси, %
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0.5	24	40	30
<i>Curvularia lunata</i>	1.0	20	90	65
<i>Fusarium sp.</i>	0.5	24	50	40
<i>Rhizopus nigricans</i> *	0.5	48	70	40

*-растущая культура

С помощью мицелия указанного штамма *C. lunata* удалось получить 7 α -гидроксипроизводные АДЭА с содержанием продукта 65%, а также некоторых других стероидных Δ^5 -олефинов при нагрузках, увеличенных до 2 г/л. Однако, только в случае 5-олефинов андростанового ряда (ДЭА, АДЭА, 3 β ,17 β -дигидроксиандрост-5-ена (ДГА), его ацетата (АДГА)) трансформация проходила регио- и стереоселективно без образования побочных продуктов.

7 α -гидроксилирование Δ^5 -3 β -гидроксистероидов в присутствии ХМЦ. Следующие Δ^5 -3 β -гидроксистероиды использованы как субстраты для трансформации: ДЭА, АДЭА, ДГА, АДГА, прегненолон (Δ^5 -ПГ), 16,17 α -оксидопрегненолон (Δ^5 ОПГ), моноацетат (MAR) и триацетат (TAR) вещества «Р» Рейхштейна. Результаты гидроксилирования АДЭА, выполненного при нагрузке 10 г/л в присутствии ЦД, МЦД и ГПЦД, представлены в табл. 11.

Таблица 11. Влияние циклодекстринов на трансформацию АДЭА при нагрузке 10 г/л

Полимер	Содержание стероидов в реакционной смеси, %			Выход 7 α -гидрокси-ДЭА, %
	АДЭА	ТГА	7 α -гидрокси-ДЭА	
β -ЦД	45	5	50	20,5
МЦД	5	3	92	77
ГПЦД	10	следы	90	65
Контроль*	70	15	15	9

*трансформация без полимера

За 44 ч трансформации в присутствии МЦД достигнута максимальная степень конверсии АДЭА в 7 α -гидрокси-ДЭА, который выделен с выходом 77%. Высокое содержание 7 α -гидрокси-ДЭА в реакционной смеси (90%) наблюдалось также при использовании ГПЦД. Однако ГПЦД, по сравнению с МЦД образовывал более прочный комплекс с 7 α -гидрокси-ДЭА, что затруднило выделение продукта, и вследствие чего он был получен с меньшим

выходом – 65% (табл.12). При солюбилизации АДЭА с помощью ЦД содержание 7 α -гидрокси-ДЭА в реакционной массе не превышало 50%. Кроме того, ЦД образовывал с ним еще более прочный комплекс, чем ГПЦД, вследствие чего выход выделенного продукта составил лишь 20.5% (табл. 11).

При трансформации ДГА в количестве 2 г/л (в виде микрокристаллов, либо в виде комплекса с МЦД) полная конверсия в ТГА наблюдалась через 20-24 ч инкубации. При нагрузке ДГА 5 г/л, трансформируемого в виде микрокристаллов, конверсия субстрата даже через 48 ч была неполной и количество 7 α -гидроксипродукта не превышало 20%. Трансформация ДГА в виде комплекса с МЦД заканчивалась за 30 ч, содержание ТГА в реакционной смеси составило 80% (табл. 12).

Таблица 12. Продукты гидроксилирования Δ^5 -3-гидроксистероидов стероидов мицелием *S. lunata*, образуемые в присутствии и в отсутствие МЦД

Стероидный субстрат	Нагрузка, г/л	Основные продукты трансформации	Содержание основных продуктов, %	
			МЦД	Контроль*
ДГА	5.0	7 α -гидрокси-ДГА	80	20
АДЭА	10.0	7 α -гидрокси-ДЭА	95	15
Δ^5 ПГ	2.0	7 α ,11 β -дигидрокси- Δ^5 -ПГ	70	10
Δ^5 ОПГ	2.0	7 α -ОН- Δ^5 ОПГ	80	75
MAR	2.0	В-во «R»	30	-
		7 α -гидрокси-«R»	30	15
		11 β -гидрокси-«R»	25	10
TAR	1.0	В-во «R»	60	-
		7 α -гидрокси-«R»	20	7
		11 β -гидрокси-«R»	15	5

*- без солюбилизатора

Получить практически значимый выход гидроксипроизводных Δ^5 -ПГ и ацетатов вещества «R» даже при низкой нагрузке 2 г/л оказалось возможным лишь в присутствии МЦД (табл. 12). В отсутствие солюбилизатора через 27 ч трансформации Δ^5 -ПГ и 23 ч трансформации MAR и TAR общий выход выделенных стероидов составил не более 10-25%, по-видимому, вследствие интенсивной деструкции как исходного субстрата, так и продуктов реакции. Выход 7-гидроксипроизводных в присутствии МЦД превышал контрольные значения в 2-7 раз (табл. 12). Следует отметить, что продукты трансформации MAR и TAR, также как и продукты трансформации ГМПД мицелием *S. lunata* в доступной литературе не описаны.

ВЫВОДЫ

1) Изучена стероид солубилизирующая активность 17 водорастворимых синтетических и природных полимеров, проявляемая в процессах трансформации стероидов бактериями и грибами. Установлено, что солубилизирующая активность полимеров класса N-виниламидов возрастает с увеличением их молекулярной массы и достигает максимума у полимеров с молекулярной массой 500-2000 кДа. У природных полимеров – циклодекстринов – солубилизирующая активность определяется наличием и характером заместителя в молекуле олигосахарида, при этом лучшие результаты получены в присутствии метил- β -циклодекстрина (МЦД).

2) Установлено, что оптимальной концентрацией полимеров класса N-виниламидов в процессе 1,2-дегидрирования метилтестостерона бактерией *Pimelobacter simplex* является 1% для ПВК и 3.5% для ПВП. Оптимальным мольным соотношением МЦД/стероид в процессах 1,2-дегидрирования является 1.2:1, а в процессах гидроксирования грибами – 0.8:1.

3) Определены оптимальные условия, обеспечивающие количественный выход целевого продукта в процессе 1,2-дегидрирования: рН 7.2, количество биомассы – 4 г/л, концентрация метанола – 7%, присутствие индуктора 3-кетостероиддегидрогеназы, среда для трансформации – деминерализованная вода, солубилизатор – МЦД. Разработан эффективный одностадийный метод 1,2-дегидрирования МТС при нагрузке субстрата до 20 г/л в растворе МЦД.

4) Впервые для гидроксирования (7α -, 11β - и 14α -) стероидов плесневыми грибами использованы химически модифицированные циклодекстрины. В результате трансформации Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксистероидов ряда андростана и прегнана мицелием *Curvularia lunata* в присутствии МЦД получено 17 гидроксипроизводных, из которых 4 стероида не описаны в литературе. Установлено, что в присутствии МЦД в случае гидроксирования стероидов продукты трансформации содержатся только в водной фазе, что существенно облегчает их выделение в кристаллическом виде.

5) Разработан способ получения 7α -гидроксипроизводных стероидных 5-олефинов с помощью нового штамма *Curvularia lunata* ВКПМ F-981. Способ позволяет достигнуть 95% выхода 7α -гидроксистероидов в присутствии МЦД при нагрузке стероидного субстрата 10 г/л.

6) Показано, что МЦД можно рассматривать как универсальный солубилизатор, эффективный в процессах трансформаций стероидных соединений различной структуры, осуществляемых как бактериями, так и грибами. При этом была показана возможность его повторного использования после выделения продуктов реакции.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

- 1). Дружинина А.В., Андриюшина В.А., Аринбасарова А.Ю., Пашкин И.И., Савинова Т.С., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. Бактериальное 1,2-дегидрирование 17α -метилтестостерона в присутствии синтетических полимеров. Биотехнология, 2008; №1, с. 46-50.
- 2). Дружинина А.В., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. Превращение 17α -метилтестостерона в метандростенолон с помощью бактерии *Pimelobacter simplex*

ВКПМ АС-1632 в присутствии циклодекстринов. Прикладная биохимия и микробиология. 2008; т. 44, № 6, 642-646.

3). Андрияшина В.А., Войшвилло Н.Е., **Дружинина А.В.**, Стыценко Т.С., Скрыбин К.Г. Новая технология получения высокоактивных дегидроаналогов стероидов. VI Международный Форум «Биотехнология и современность», г.Санкт-Петербург. Тезисы, стр. 44-45, 2005.

4). **Дружинина А.В.**, Ядерец В.В., Войшвилло Н.Е., Стыценко Т.С., Андрияшина В.А. «Применение полимеров в микробиологических процессах трансформации стероидов» Тезисы докладов VII Международного форума «Биотехнология и современность», стр. 30-31, 2006.

5). **Дружинина А.В.** Получение тестостерона и гидрокситестостерона с помощью гриба *Beauveria sp.* Тезисы I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты», с.34, Пушкино, 2007.

6). **Дружинина А.В.**, Ядерец В.В. 14 α -гидроксилирование андростендиона грибом *Curvularia lunata* LBS в присутствии природных и синтетических полимеров. Тезисы докладов XX зимней международной молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, с.132, 2008.

7). **Дружинина А.В.** Микробиологический способ получения 7 α -гидроксиандростенов. Наука и технологии. Краткие сообщения XXVIII Российской школы, стр. 61-63, г. Миасс, июнь 2008г.

8). Андрияшина В.А., **Дружинина А.В.**, Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. 7 α -гидроксилирование стероидных 5-олефинов плесневыми грибами. Прикладная биохимия и микробиология, 2010, Т. 46, №1, с. 1-6.

9). Андрияшина В.А., Войшвилло Н.Е., **Дружинина А.В.**, Стыценко Т.С., Ядерец В.В., Скрыбин К.Г. Микробиологический способ получения 7 α -гидроксиандростенов. Патент РФ № 2 377 309 (Бюлл. №36 от 27.12.2009).

10). Андрияшина В.А., Войшвилло Н.Е., Стыценко Т.С., **Дружинина А.В.**, Родина Н.В., Ядерец В.В. Разработка научных основ технологий получения стероидных лекарственных субстанций из отечественного сырья. Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств. Материалы симпозиума. Москва. 2008. Стр. 11.

11). Андрияшина В.А., Войшвилло Н.Е., **Дружинина А.В.**, Стыценко Т.С., Ядерец В.В., Скрыбин К.Г., Бартошевич Ю.Э., Новак М.И., Домрачева А.Г. Способ 11 β -гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов. Патент РФ № 2399674 (Бюлл. № 26 от 20.09.2010)

12). Андрияшина В.А., **Дружинина А.В.**, Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. Гидроксилирование стероидов мицелием *Curvularia lunata* в присутствии метил- β -циклодекстрина. Прикладная биохимия и микробиология, 2011, Т. 47, №1, с. 1-7.

Автор выражает глубокую признательность своим научным руководителям к.х.н. Андрияшиной В.А. и к.б.н. Войшвилло Н.Е. за всестороннюю поддержку при выполнении диссертации, к.х.н. Стыценко Т.С. за неоценимую помощь при планировании и выполнении работы, Соловьёвой Н.П. за помощь в снятии и интерпретации ПМР спектров, Пашкину И.И. и Рухле Е.Г. за предоставление образцов полимеров, Комбаровской С.П. за ценные советы, а также всем сотрудникам лаборатории Биотехнологии стероидов Центра «Биоинженерия» РАН.