

УДК 577.66:579.222

ТРАНСФОРМАЦИЯ 2- И 4-ЦИАНОПИРИДИНОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Ю. Г. Максимова*, Д. М. Васильев**, Г. В. Овечкина*,
А. Ю. Максимов*, **, В. А. Демаков*, **

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081; e-mail: maks@iegm.ru

**Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

Поступила в редакцию 25.12.2012 г.

Изучена динамика трансформации 2- и 4-цианопиридина суспендированными и адсорбированными на неорганических носителях клетками штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью, и *Pseudomonas fluorescens* C2, содержащими нитрилазу. Определено, что и нитрилгидратазная, и нитрилазная активность по 2-цианопиридину у иммобилизованных клеток в 1.5–4 раза ниже, чем таковая по 4-цианопиридину, и в 1.6–2 раза ниже, чем активность свободных клеток по 2-цианопиридину. Показана возможность получения изоникотиновой кислоты при совместной конверсии 4-цианопиридина смешанной суспензией клеток штамма *R. ruber* gt1 с высокой нитрилгидратазной активностью и *R. erythropolis* 11-2 с выраженной амидазной активностью. Показано, что иммобилизация клеток родококков на угле-сырце и клеток псевдомонад на каолине позволяет получить гетерогенный биокатализатор для эффективной трансформации цианопиридинов в соответствующие амиды и карбоновые кислоты.

DOI: 10.7868/S0555109913040089

Пиридинзамещенные амиды и карбоновые кислоты – предшественники ряда фармацевтических препаратов и различных востребованных в народном хозяйстве химических соединений. Изоникотиновая кислота является промежуточным продуктом в синтезе ряда противотуберкулезных препаратов группы гидразида изоникотиновой кислоты (изониазид, фтивазид, метазад и др.), антидепрессантов – ингибиторов моноаминоксидазы, хинуклидиновых лекарственных средств (фенкарол, оксалидин, ацеклидин). Некоторые производные пиколиновой кислоты, в частности 6-метилпиколиновая кислота, – промежуточные продукты в синтезе фармацевтических препаратов, например димеколина [1]. Высокоактивные гербициды лонтрел и пиклорам – хлор- и аминзамещенные производные пиколиновой кислоты [2].

Основным природным источником пиридиновых соединений являются продукты коксования каменного угля. В химико-фармацевтическом производстве β-пиколиновую фракцию (предшественник никотинамида и никотиновой кислоты), содержащуюся в коксовом газе, подвергают конденсации в жестких условиях под давлением с формалином. Присутствующую в ней γ-пиколиновую фракцию (предшественник изоникотиновой кислоты) отделяют формалином с последующей отгонкой и окислением азотной

кислотой [1]. Известен также химический гидролиз цианопиридинов, который инициируется повышенной температурой и характеризуется неконтролируемой экзотермичностью [3]. Так, никотиновую кислоту получают химическим синтезом, включающим стадию окисления 2-метил-5-этилпиридина, или гидролизом 3-цианопиридина при высоких температурах (330°C) и давлении (290 атм.) [4]. Биологический способ получения ароматических амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов, основанный на ферментативном гидролизе, выгодно отличается от химического мягкими условиями проведения процесса, экологической безопасностью и высокой степенью конверсии.

Ферментативный гидролиз цианопиридинов до соответствующих амидов и карбоновых кислот осуществляется ферментами нитрилгидратазно-амидазной и нитрилазной систем микроорганизмов. Способность к трансформации ароматических нитрилов встречается как у представителей родов бактерий *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* [4–7], так и среди грибов родов *Fusarium*, *Giberella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* и др. [8]. Известны биотехнологические процессы, основанные на гидролизе алифатических нитрилов.

Так, компанией “Биоамид” (г. Саратов, Россия) был внедрен процесс, заключающийся в биокаталитическом производстве акрилата аммония из нитрила акриловой кислоты штаммом *Alcaligenes denitrificans* C-32 – продуцентом нитрилазы (КФ 3.5.5.1) [9]. Крупнотоннажное производство акриламида основано на гидратации акрилонитрила клетками штамма *R. rhodochrous* J1 (Япония) [10] и штамма *R. rhodochrous* M8 (Россия) [11], обладающими высокой нитрилгидратазной активностью. Промышленно значимый штамм *R. rhodochrous* J1 также применяется в биокаталитическом производстве никотинамида, причем в зависимости от культуральной среды он может продуцировать нитрилгидратазу (КФ 4.2.1.84) или нитрилазу. Известно, что нитрилаза этого штамма проявляет высокое родство к 4-цианопиридину, хотя неактивна по отношению к 2-цианопиридину [12, 13]. В отличие от процесса получения никотинамида и никотиновой кислоты ферментативным путем, в научной литературе недостаточно описано биокаталитическое получение изоникотиновой и пиколиновой кислот, а также нет сведений об их успешном синтезе с выходом на промышленный уровень. При трансформации 2- и 4-цианопиридинов представляет интерес получение пиридинзамещенных карбоновых кислот, а не амидов, что может быть осуществлено штаммом микроорганизмов, содержащим активную нитрилазу, либо нитрилгидратазно-амидазную ферментную систему с амидазой (КФ 3.5.1.4), сравнимой по активности с нитрилгидратазой. Одним из решений данной задачи может быть разработка биокатализатора в виде смешанных бактериальных культур.

Цель работы – поиск наиболее предпочтительных путей биокаталитического получения изоникотиновой и пиколиновой кислот из соответствующих цианопиридинов, а также разработка гетерогенного биокатализатора на основе адсорбционно-иммобилизованных нерастущих клеток нитрилгидролизующих бактерий.

МЕТОДИКА

Штаммы нитрилутилизирующих бактерий *R. ruber* gt1 [14], *P. fluorescens* C2, *R. erythropolis* 11-2, выделенные из образцов почв, выращивали в колбах объемом 1 л на шейкере со скоростью вращения 100 об/мин при 30°C на минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 7.2–7.4. В качестве источника углерода использовали глюкозу в концентрации 0.1%. Источником азота для штамма *R. ruber* gt1 являлся хлористый аммоний в концентрации 10 мМ, для *P. fluorescens* C2 и *R. erythropolis* 11-2 – ацетонитрил в концентрации 0.5 и 0.05% соответственно.

Трансформацию 100–200 мМ растворов 2- и 4-цианопиридинов осуществляли в 10–20 мл калий-фосфатного буфера (pH 7.2 ± 0.2) при 30°C в течение 1–48 ч. В качестве катализатора вносили отмытые калий-фосфатным буфером клетки *R. ruber* gt1 (0.6 мг/мл) и *P. fluorescens* C2 (2.6 мг/мл), выращенные до стационарной фазы роста, в которой данный штамм родококков проявляет максимальную нитрилгидратазную, а штамм псевдомонад – максимальную нитрилазную активность. Культуру *R. erythropolis* 11-2 выращивали до поздней логарифмической фазы роста, в которой данная культура проявляет максимальную амидазную активность. Совместную трансформацию субстратов осуществляли отмытыми клетками *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2, вносимыми в реакционную среду в соотношении 11/13.5 мг по сухой массе. Реакцию проводили в 22 мл калий-фосфатного буфера в течение 3 ч: 1 ч при 30°C и 2 ч при 50°C.

Удельную активность нитрилгидратазы и нитрилазы выражали в ммольях амида (карбоновая кислота)/г сухих клеток · ч.

Адсорбционную иммобилизацию клеток штамма *P. fluorescens* C2 на каолине (“Merck”, Германия) и *R. ruber* gt1 на измельченном до порошкообразного состояния угле-сырце с размером частиц 50–300 мкм (Россия) проводили в течение 1 ч при 30°C при перемешивании на шейкере при 140 об/мин, носитель отделяли на фильтре (“синяя лента”), отмывали калий-фосфатным буфером и учитывали количество несвязавшихся клеток. Трансформацию цианопиридинов иммобилизованными клетками проводили в тех же условиях, как и реакции, катализируемую суспендированными клетками. Концентрация иммобилизованных и суспендированных (в пересчете на сухую массу) клеток в реакционной среде была одинакова.

Концентрацию изоникотиновой и пиколиновой кислот определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Luna 5u C 18(2) 100A (250 × 4.6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ KH_2PO_4 и 25% ацетонитрила, скорость потока составляла 0.5 мл/мин при 25°C, детекцию проводили при длине волны 200 нм.

Адсорбцию 100 мМ растворов 2-, 4-цианопиридинов, пиколинамида и пиколиновой кислоты, изоникотинамида и изоникотиновой кислоты на угле-сырце и каолине определяли по разнице концентрации этих веществ в надосадочной жидкости после 2 ч инкубации с 500 мг носителя при 30°C.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel 2003 с использованием *t* критерия Стьюдента, результаты представлены средними величинами по трем независимым опытам. Уровень значимости α принимали равным 0.05.

Активность суспендированных и иммобилизованных нитрилутилизующих бактерий по отношению к 2- и 4-цианопиридину, ммоль/г·ч

Образец	2-цианопиридин	4-цианопиридин
<i>R. ruber</i> gt1, нитрилгидратазная активность		
Суспензия	887.70 ± 106.43	803.70 ± 53.51
Иммобилизованные клетки	460.20 ± 84.74	702.40 ± 25.49
<i>P. fluorescens</i> C2, нитрилазная активность		
Суспензия	8.81 ± 1.18	19.63 ± 1.65
Иммобилизованные клетки	5.35 ± 1.37	21.53 ± 3.32

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Трансформация 2- и 4-цианопиридина суспендированными и иммобилизованными клетками штамма *R. ruber* gt1, содержащими нитрилгидратазу. Суспензия клеток *R. ruber* gt1 и адсорбированные на угле-сырце клетки трансформировали 2- и 4-цианопиридин до пиколинамида и изоникотинамида соответственно. Нитрилгидратазная активность суспендированных клеток по этим субстратам достоверно не различалась, а при иммобилизации наблюдалось незначительное снижение активности по 4-цианопиридину (таблица). В то же время активность по 2-цианопиридину у иммобилизованных клеток была ниже, чем у свободных в 1.4–2.6 раза и в 1.2–2 раза ниже, чем по 4-цианопиридину у иммобилизованных клеток. Ранее нами было установлено повышение нитрилгидратазной и нитрилазной активностей при трансформации акрилонитрила адсорбированными на углеродсодержащих носителях клетками родококков и псевдомонад в сравнении с ферментативными активностями суспендированных клеток [15]. Следует отметить, что эффективность гетерогенного биокатализа во многом зависит от того, приводит иммобилизация клеток к ограничениям массопереноса или нет. Определенную роль в диффузионных затруднениях могут играть не только физико-химические характеристики носителя, но и химическая природа субстратов и продуктов ферментативной реакции. Можно предположить, что ароматические нитрилы, амиды и карбоновые кислоты в большей степени подвержены этим диффузионным затруднениям, чем алифатические. Для данного процесса были подобраны носители, которые позволили получить иммобилизованный биокатализатор, активность которого сохранялась либо незначительно снижалась по сравнению с суспендированными клетками. Динамика трансформации 2- и 4-цианопиридина иммобилизованными и свободными клетками показана на рис. 1.

Чтобы определить, происходит ли накопление субстрата и продукта в клетке, после полной конверсии клетки родококков разрушали ультразвуком и определяли концентрацию продукта и субстрата в цитоплазме. Было показано, что 4-цианопиридин в клетке отсутствовал, 2-цианопиридин обнаруживался в следовых количествах, а накопление изоникотинамида и пиколинамида в цитоплазме составило 7.3 и 4.8 мкмоль/мг сухих клеток соответственно.

Трансформация 2- и 4-цианопиридина суспендированными и иммобилизованными клетками штамма *P. fluorescens* C2, содержащими нитрилазу. Суспендированные и адсорбированные на каолине клетки штамма *P. fluorescens* C2 катализировали гидролиз 2- и 4-цианопиридина в пиколиновую и изоникотиновую кислоту соответственно. Показано, что нитрилазная активность суспендированных клеток по отношению к 4-цианопиридину в 2.2 раза выше, чем по отношению к 2-цианопиридину (таблица). Активность иммобилизованных на каолине и свободных клеток псевдомонад при трансформации 4-цианопиридина достоверно не различается. Адсорбированные клетки трансформируют 2-цианопиридин с незначительно меньшей скоростью, чем свободные. Динамика трансформации этих гетероциклических нитрилов свободными и иммобилизованными клетками *P. fluorescens* C2 показана на рис. 2. Сравнивая трансформацию этих субстратов клетками штаммов нитрилутилизующих бактерий, можно заключить, что 2-цианопиридин является более сложным субстратом как для нитрилгидратазы, так и для нитрилазы, т.к. образует в водной среде эмульсию. Диспергированные частицы 2-цианопиридина, по-видимому, сначала адсорбируются клеточной стенкой бактерий и затем проникают в клетку, т.к. после смешивания суспензии бактерий с эмульсией дисперсная фаза не визуализируется.

Совместная трансформация 4-цианопиридина штаммами *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2. Изоникотиновая кислота может быть получена при совместной трансформации 4-цианопиридина суспензией клеток штамма *R. ruber* gt1, обладающего высокой нитрилгидратазной активностью, и *R. erythropolis* 11-2 с выраженной амидазной активностью. Показано, что цианопиридин полностью трансформируется в амид за 30 мин реакции нитрилгидратазой штамма *R. ruber* gt1, а образующийся амид конвертируется в изоникотиновую кислоту амидазой штамма *R. erythropolis* 11-2 (рис. 3). Скорость конверсии ограничена активностью амидазы, которая не превышала 10 ммоль/г·ч, что более чем на порядок ниже нитрилгидратазной. При сравнении двух способов получения изоникотиновой кислоты было показано, что гидролиз цианопиридина нитрилазой штамма *P. fluorescens* C2 более эффективен, т.к. его актив-

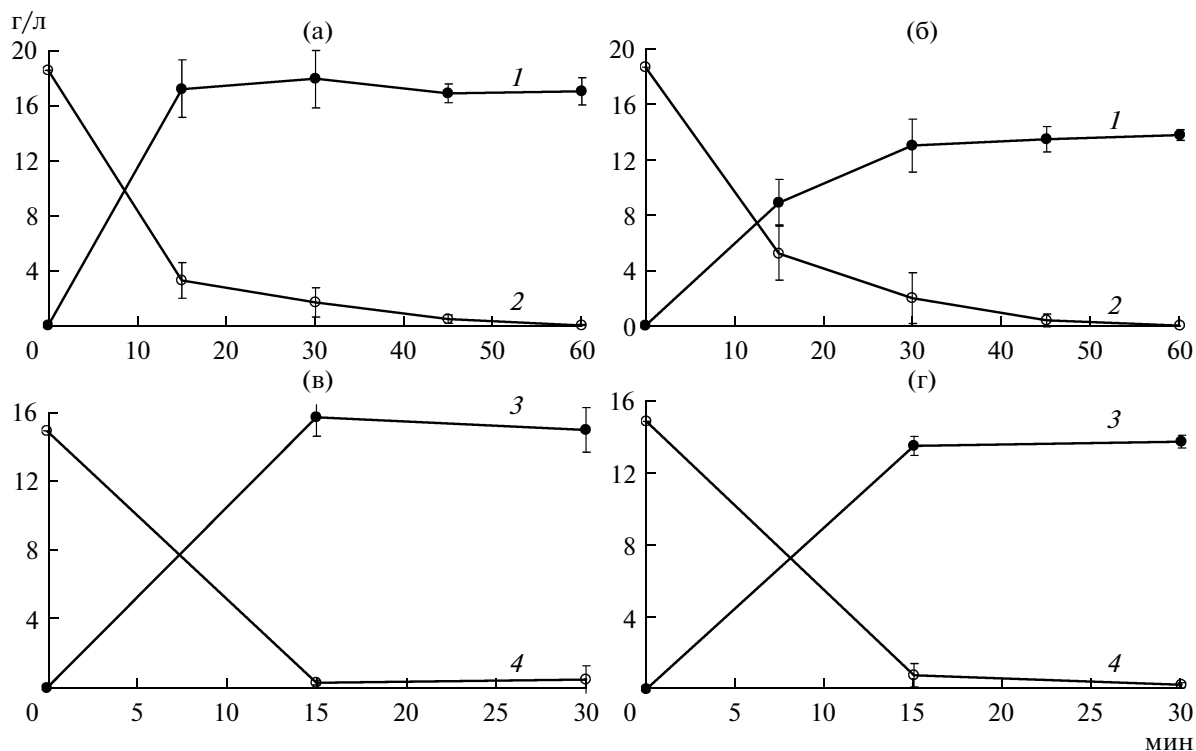


Рис. 1. Динамика трансформации 2-цианопиридина (а, б) и 4-цианопиридина (в, г) суспензией клеток *R. ruber* gt1 (а, в) и клетками, адгезированными на угле-сырце (б, г): 1 – пиколинамид, 2 – 2-цианопиридин; 3 – изоникотинамид, 4 – 4-цианопиридин.

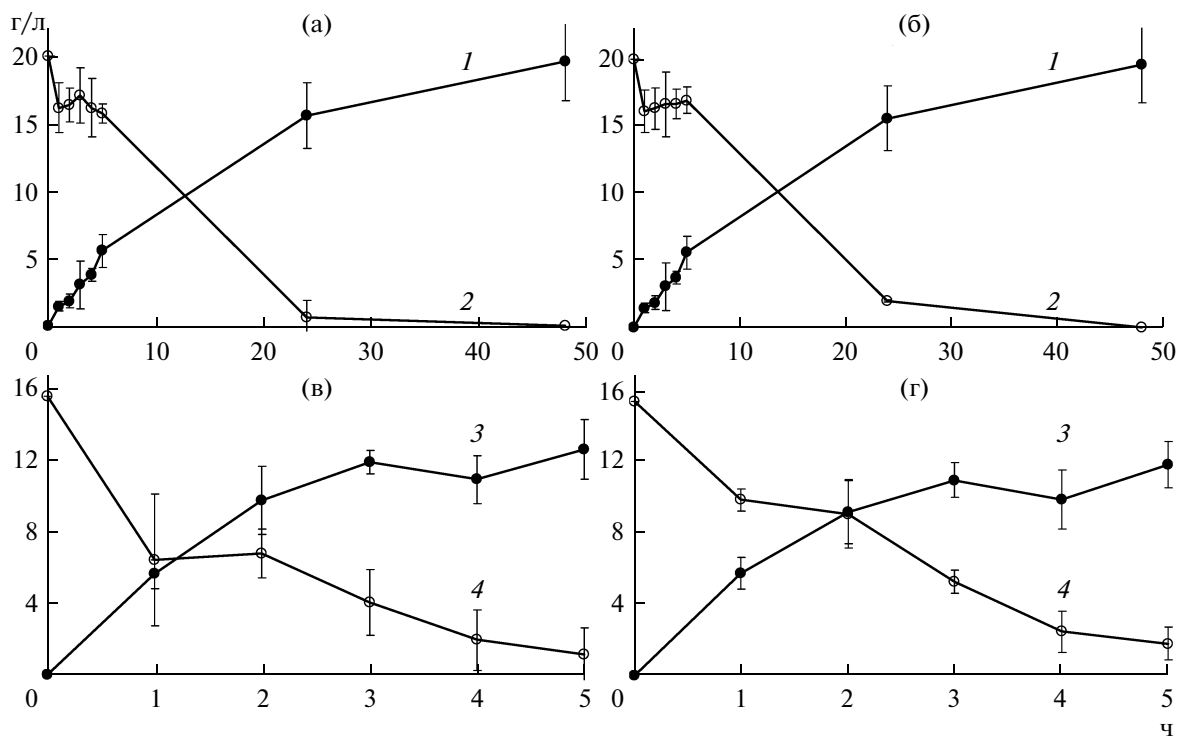


Рис. 2. Динамика трансформации 2-цианопиридина (а, б) и 4-цианопиридина (в, г) суспензией клеток *P. fluorescens* C2 (а, в) и клетками, адгезированными на каолине (б, г): 1 – пиколиновая кислота, 2 – 2-цианопиридин; 3 – изоникотиновая кислота, 4 – 4-цианопиридин.

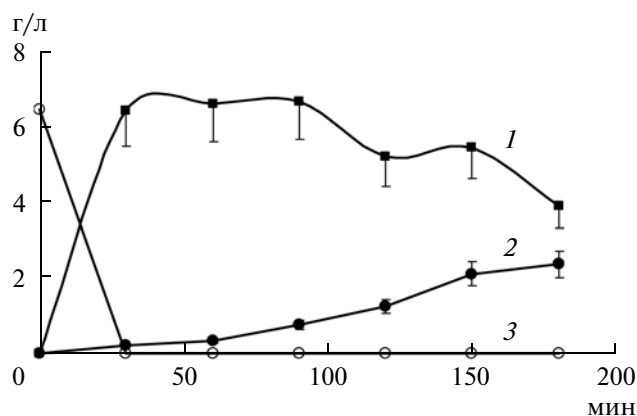


Рис. 3. Совместная трансформация 4-цианопиридина штаммами *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2: 1 – изоникотинамид; 2 – изоникотиновая кислота; 3 – 4-цианопиридин.

ность по данному субстрату превышает таковую амидазы штамма *R. erythropolis* 11-2 в два раза.

Таким образом, пиколиновая и изоникотиновые кислоты могут быть получены при гидролизе соответствующих цианопиридинов как суспендированными клетками штаммов *P. fluorescens* C2, содержащими нитрилазу, так и совместной конверсией смешанной суспензией клеток штаммов *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2, обладающими высокой нитрилгидратазной и амидазной активностями соответственно. Следует отметить, что в данном случае конверсия нитрилазой была предпочтительнее в результате ее более высокой активности по сравнению с амидазой. Адгезия клеток родококков и псевдомонад на неорганических носителях позволяет получить активный гетерогенный биокатализатор гидролиза ароматических нитрилов. В научной литературе содержится недостаточно сведений о трансформации цианопиридинов иммобилизованными клетками бактерий. По данным литературы, иммобилизованные методом включения в структуру геля альгината кальция клетки *Bacillus pallidus* Dac521 сохраняли 98% своей первоначальной активности при трансформации 3-цианопиридина, при этом нитрилазная активность составляла лишь 37 нмоль/мг · мин при 50°C. В сравнении со штаммом *B. pallidus* Dac521, содержащим термофильную нитрилазу, клетки *Nocardia rhodochrous* (*R. rhodochrous*) LL100-21, нитрилаза которых мезофильна, сохраняли только 38% активности при иммобилизации в структуре геля альгината кальция, хотя при этом активность составляла 61 нмоль/мг · мин при 30°C [4]. Адсорбционная иммобилизация по сравнению с включением клеток в структуру геля не приводит к ограничениям массопереноса и позволяет проводить ферментативную трансформацию без повышения температуры, которое необходимо для преодоления диф-

фузионных затруднений в гелевой матрице. Ранее нами было установлено, что использование активированных углеродных носителей для иммобилизации клеток нитрилутилизующих бактерий предпочтительно для процесса трансформации алифатических субстратов [16]. Наоборот, при конверсии ароматических субстратов предпочтительно отдавать неактивированным носителям (по нашим данным, это уголь-сырец для родококков, обладающих гидрофобной клеточной стенкой, и каолин для псевдомонад с гидрофильной поверхностью), т.к. неактивированные носители не адсорбировали ароматические субстраты и продукты реакции. Таким образом, было выявлено, что выбор носителя для иммобилизации биокатализатора зависит не только от свойств биологического агента (в данном случае гидрофобности/гидрофильности поверхности бактериальных клеток), но и от самого биокаталитического процесса, используемых в нем субстратов и получаемых продуктов.

При периодической загрузке реакторов прекращение конверсии по достижении определенной концентрации продукта в реакционной среде может быть обусловлено различными факторами: ингибированием самой ферментной системы субстратом или накапливающимся продуктом, прекращением процессов транспорта продукта из клетки в результате возрастания его концентрации в реакторе, общим снижением ферментативной активности. Это может быть в определенной мере преодолено при переходе на непрерывный способ конверсии, представленный колоночным реактором, заполненным гетерогенным биокатализатором в виде иммобилизованных клеток.

Работа поддержана Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яхонтов Л.М., Глушков Р.Г. Синтетические лекарственные средства / Ред. А.Г. Натрадзе. М.: Медицина, 1983. 272 с.
2. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. 712 с.
3. Патент РФ. 2001. № 2175968.
4. Almatawah Q.A., Covan D.A. // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. P. 718–724.
5. Kamble A., Banerjee U.C. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 151. P. 143–150.
6. Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martínková L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M. // Enzyme Microb. Technol. 2010. V. 47. P. 64–70.
7. Забазная Е.В., Козулин С.В., Воронин С.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 4. С. 337–381.
8. Kaplan O., Nikolaou K., Pišvejcová A., Martínková L. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 38. P. 260–264.

9. Глинский С.А., Козулин С.В., Козулина Т.Н., Полтавская С.В., Яненко А.С., Леонова Т.Е. // Биотехнология. 2010. № 1. С. 17–24.
10. Asano Y. // J. Biotechnol. 2002. V. 94. P. 65–72.
11. Астаурова О.Б., Ларикина Г.А., Полякова И.Н., Яненко А.С. // Биотехнология. 1993. № 11–12. С. 6–8.
12. Nagasawa T., Mathew C.D., Mauger J., Yamada H. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 7. P. 1766–1769.
13. Mathew C.D., Nagasawa T., Kobayashi M., Yamada H. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 4. P. 1030–1032.
14. Патент РФ. 2004. № 2223316.
15. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 51–58.
16. Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 193–198.

Transformation of 2- and 4-Cyanopyridines by Free and Immobilized Cells of Nitrile-Hydrolyzing Bacteria

Yu. G. Maksimova^a, D. M. Vasilyev^b, G. V. Ovechkina^a, A. Yu. Maksimov^{a, b}, and V. A. Demakov^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia
e-mail: maks@iegm.ru

^b Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia

Received December 25, 2012

Abstract—The transformation dynamics of 2- and 4-cyanopyridines by cells suspended and adsorbed on inorganic carriers has been studied in the *Rhodococcus ruber* gt1 strain possessing nitrile hydratase activity and the *Pseudomonas fluorescens* C2 strain containing nitrilase. It was shown that both nitrile hydratase and nitrilase activities of immobilized cells against 2-cyanopyridine were 1.5–4 times lower compared to 4-cyanopyridine and 1.6–2 times lower than the activities of free cells against 2-cyanopyridine. The possibility of obtaining isonicotinic acid during the combined conversion of 4-cyanopyridine by a mixed suspension of *R. ruber* gt1 cells with a high level of nitrile hydratase activity and *R. erythropolis* 11-2 cells with a pronounced activity of amidase has been shown. Immobilization of *Rhodococcus* cells on raw coal and *Pseudomonas* cells on china clay was shown to yield a heterogeneous biocatalyst for the efficient transformation of cyanopyridines into respective amides and carbonic acids.