

Член-корреспондент АН СССР Г. К. СКРЯБИН, Л. А. ГОЛОВЛЕВА,
Л. В. АНДРЕЕВ, З. И. ФИНКЕЛЬШТЕЙН, С. Н. НОВИК

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРОБНЫМИ КУЛЬТУРАМИ

Впервые процесс соокисления был установлен в лаборатории Фостера, показавшего возможность микробиологического окисления этана, пропана и бутана в средах, содержащих метан, который эти микроорганизмы окисляли для своего роста и развития (¹). В дальнейшем в работах (²⁻⁵) было показано микробиологическое окисление моно- и дициклических углеводов до соответствующих кислот.

Затем в соокислительных условиях при росте культуры на *n*-алканах была получена никотиновая кислота путем энзиматического окисления 3-метилпиридина (^{6, 7}). Показано, что 3-метилпиридин окисляется до никотиновой кислоты с выходом 80%, процесс соокисления идет не только при росте культуры на *n*-алканах, но и на субстратах другой структуры — изоалканах, некоторых аминокислотах. Соокислительные условия необходимы на первом этапе окисления 3-метилпиридина. Окисление 3-метилпиридина идет через образование 3-оксиметилпиридина.

Задачей настоящей работы являются поиски новых активных культур-трансформаторов, дальнейшая интенсификация процесса и изучение механизма окисления.

В этих целях было проведено изучение свыше 350 культур микроорганизмов различных таксономических групп, окисляющих гетероциклические соединения до соответствующих кислот. Отбор культур проводили тремя способами: а) с применением накопительных культур на средах, содержащих *n*-алканы в качестве источника углерода; б) с помощью накопительных культур с алкилпиридинами в качестве источника углерода и в) с помощью накопительных культур на средах, содержащих смесь *n*-алканов и алкилпиридинов в качестве источника углерода (табл. 1).

При использовании накопительных культур с алкилпиридинами и *n*-парафинами в обычных (не соокислительных условиях) не удавалось выделить активных культур или выделялись культуры, расщепляющие пиридиновое кольцо, и окисление гетероциклических соединений до соответствующих кислот не наблюдалось.

Оказалось, что наибольшее число активных штаммов (свыше 50%), проводящих трансформацию в соокислительных условиях, было среди микроорганизмов, относимых нами к родам *Nocardia* и *Arthrobacter* (табл. 1).

При изучении процесса трансформации было выяснено, что образующаяся никотиновая кислота в определенных концентрациях начинает ингибировать дальнейшее окисление 3-метилпиридина. Добавление в культуральную жидкость ионообменной смолы Amberlite IR-45 позволило снять эффект ингибирования никотиновой кислоты и, кроме того, дало возможность увеличить количество вносимого 3-метилпиридина более чем в 5 раз (концентрация смолы в мл/л: 0, 100, 200, 300; количество никотиновой кислоты из 3-метилпиридина в г/л соответственно: 3,20; 8,10; 14,31; 16,73).

Была изучена возможность трансформации 3-метилпиридина в условиях непрерывной ферментации. Установлено, что в условиях хемостата при скорости протока 0,025—0,05 час⁻¹ оказалось возможным проведение окисления 3-метилпиридина в никотиновую кислоту.

Таким образом, наряду с регулированием подачи ростового и трансформируемого субстратов, описанного нами ранее (8), применение метода непрерывной трансформации и ионообменных смол в целях интенсификации

процесса получения никотиновой кислоты позволило нам значительно повысить выход кислоты.

Одним из вопросов, важных для изучения механизма окисления 3-метилпиридина, являлось выяснение наличия индуктивных и конститутивных энзимов. Ранее нами было показано (8), что культура *Nocardia* sp. 77A, выращенная на мясопептонном агаре, сусло-агаре, углеводах и ряде других субстратов, не окисляла 3-метилпиридин до никотиновой кислоты, но легко окисляла на всех этих источниках углерода промежуточный продукт окисления — 3-оксиметилпиридин до соот-

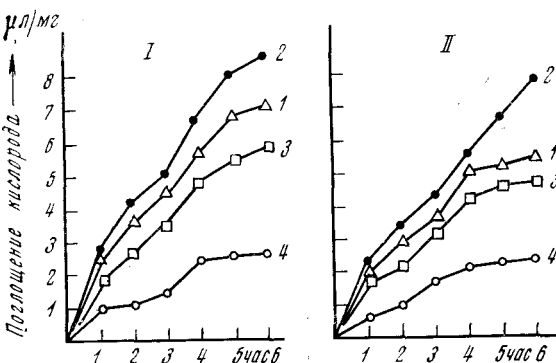


Рис. 1. Влияние хлорамфеникола на дыхательную активность культуры *Nocardia corallina*, выращенной на гексадекане с 3-метилпиридином (I) и на гексадекане (II). 1 — хлорамфеникол, 2 — 3-метилпиридин, 3 — эндогенное дыхание, 4 — хлорамфеникол + 3-метилпиридин

ветствующей кислоты. Это обстоятельство позволило нам предположить наличие конститутивных ферментов, способных окислять соответствующий спирт. Нами проведен ряд экспериментов по выявлению индуктивных ферментов. С этой целью исследовано было действие хлорамфеникола — ингибитора белкового синтеза. Способность трансформировать 3-метилпиридин в никотиновую кислоту полностью подавлялась хлорамфениколом в концентрации 100 мг/л (рис. 1). Эти данные подтверждают наличие также и индуктивных ферментов, ответственных за первичное окисление 3-метилпиридина.

Таблица 1

Сравнительная оценка методов отбора культур, проводящих окисление алкилпиридинов в соокислительных условиях

Метод отбора	Число выделенных культур	Родовой состав	Культуры, проводящие трансформацию алкилпиридинов, %
Накопительные культуры с <i>n</i> -алканами в качестве источника углерода	150	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>	52
Накопительные культуры с <i>n</i> -алканами и алкилпиридинами в качестве источника углерода	120	<i>Nocardia</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Proactinomyces</i>	16

Представилось интересным выяснить, какие из ростовых и неростовых субстратов (лейцин, валин, гексан, гексадекан, циклические углеводороды, цетиловый спирт, пальмитиновая кислота и другие) проводят индукцию процесса окисления 3-метилпиридина в условиях покоящейся и растущей

культуры *Nocardia* sp. 77A. Проверка дала отрицательный результат, ни в одном варианте не была обнаружена никотиновая кислота.

Нами было проведено первичное изучение некоторых особенностей ферментов, осуществляющих процесс окисления 3-метилпиридина. Эксперименты проводились с бесклеточными экстрактами. В этих целях изучено было действие различных ингибиторов и разобщителей дыхательной цепи парафинокисляющих бактерий: цианида калия, меркаптоэтанола, ЭДТА, FeSO_4 , Ca^{2+} , антимицина А, ротенона, хинина, восстановленного и окисленного глутатиона.

Анализ полученных данных показал, что на первом этапе в окислении 3-метилпиридина участвуют металлоэнзимы. Полное подавление активности ферментов, окисляющих гексадекан и 3-метилпиридин парахлормеркурибензоатом и меркаптоэтанолам, а также снижение активности этих энзимов в присутствии окисленного глутатиона указывает на то, что в окислении этих субстратов, вероятно, принимают участие SH-ферменты.

Проведенный отбор активных штаммов, проведение трансформации в условиях непрерывной ферментации и применение ионообменных смол позволило нам интенсифицировать процесс трансформации 3-метилпиридина в никотиновую кислоту более, чем в 5 раз. Выяснено, что при окислении 3-метилпиридина участвуют индуктивные и конститутивные энзимы; ферменты, окисляющие 3-метилпиридин на первом этапе, по-видимому, являются металлоэнзимами, и в окислении 3-метилпиридина принимают участие SH-ферменты.

Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов
Пушкино-на-Оке

Поступило
8 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. R. Leadbetter, J. W. Foster, Arch. Microbiol., 35, 92 (1960). ² I. B. Davis, R. L. Raymond, Appl. Microbiol., 9, 383 (1961). ³ I. B. Davis, R. L. Raymond, U. S. Pat. 3 057 784 (1962). ⁴ A. E. Humphry, R. L. Raymond, Brit. Pat. (1967). 1 111 340 (1966). ⁵ I. D. Douros, R. L. Raymond, N. I. Fanwood U. S. Pat., 3 340 155. ⁶ Л. А. Головлева, Г. К. Скрябин и др., Авт. свид. № 228688; Бюлл. изобр. № 32 (1968). ⁷ Г. К. Скрябин, Л. А. Головлева, В. И. Крупянко, Изв. АН СССР, сер. биол., Б, 660 (1969). ⁸ Г. К. Скрябин, Л. А. Головлева, Микробиол. пром., № 6, 53 (1970).