

ГИДРОЛИЗ АКРИЛОНИТРИЛА И 3-ЦИАНОПИРИДИНА КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

А. В. Максимова¹, Д. М. Васильев¹, М. В. Кузнецова², В. А. Демаков^{1,2}

¹ Пермский государственный университет

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Поступила в редакцию 10.08.2011 г.

Аннотация. Нитрилгидратазы двух штаммов рода *Rhodococcus*, изолированных из почвенных образцов, катализировали гидратацию акрилонитрила и 3-цианопиридина. Оптимизированы условия получения акриламида и никотинамида с использованием клеточной биомассы бактерий. При 24-часовой конверсии акрилонитрила катализаторами *R. ruber* gt1 (80 мг) и *Rhodococcus* sp. A0 (70 мг) получен 37.3 и 40.1% раствор акриламида. Биомасса штамма *R. ruber* gt1 (39 мг) трансформировала 3-цианопиридин в никотинамид, концентрация которого к концу эксперимента достигла 3.9%, у штамма *Rhodococcus* sp. A0 (39.8 мг) — 4.2%. Выявлено, что в процессе трансформации клетки депонировали продукт реакции: *Rhodococcus* sp. A0 — 8.03 ммоль и *R. ruber* gt1 — 28.02 ммоль никотинамида.

Ключевые слова: Нитрилгидратаза, *Rhodococcus*, акриламид, никотинамид.

Abstract. Nitrile hydratase of two strains of *Rhodococcus*, which were isolated from soil samples, catalyzed hydration of acrylonitrile and 3-cyanopyridine. Conditions of acrylamide and nicotinamide production were optimized by using of cell-rich fluid. During 24 h conversion of acrylonitrile by *R. ruber* gt1 (80 mg) and *Rhodococcus* sp. A0 (70 mg) acrylamide solution in a final concentration of 37.3% and 40.1% was obtained. Biomass of *R. ruber* gt1 (39.0 mg) converted 3-cyanopyridine into nicotinamide in a final concentration of 3.9%, *Rhodococcus* sp. A0 (39.8 mg) — 4.2%. Research revealed that cells stored product of transformation (*Rhodococcus* sp. A0 — 8.03 mmol, *R. ruber* gt1 — 28.02 mmol of nicotinamide).

Keywords: nitrile hydratase, *Rhodococcus*, acrylamide, nicotinamide.

ВВЕДЕНИЕ

Использование микроорганизмов и их ферментов для эффективного и экологически безопасного получения разнообразных химических соединений является одним из приоритетных направлений развития биотехнологии. Биокаталитические системы привлекают внимание химиков благодаря их уникальным свойствам: в отличие от химических катализаторов, они действуют в мягких условиях и имеют исключительно высокую избирательность действия [1].

В последние годы в связи с интенсивным развитием биотехнологии и промышленной микробиологии пристальное внимание уделяется разработке и модернизации традиционных химических производств путем введения в производственный процесс биокаталитической стадии с участием ферментов или бактериальных клеток. В большинстве случаев наиболее эффективной, стабильной и удобной для биокатализа формой являются цельные клетки, вследствие чего в биотехнологии

широко используются микробиологические процессы [2].

Первое успешное использование микробной трансформации для получения мономера акриламида было предпринято фирмой Nitto Chemical Industry (Япония) еще в 1985 г. с помощью бактерий, обладающих нитрилгидратазной активностью [3]. Сегодня используют биокатализатор 3-го поколения *R. rhodochrous* J1, продуцирующий высокомолекулярную кобальтосодержащую нитрилгидратазу [4]. Фермент катализирует превращение нитрилов карбоновых кислот в соответствующие амиды в двустадийном гидролизе. Реализован биотехнологический способ получения никотинамида [5]. В обоих технологических процессах синтез проходит при комнатной температуре и атмосферном давлении и является экологически более предпочтительным по сравнению с химическим катализом [6, 7].

Акриламид — мономер для получения водорастворимых полимеров и сополимеров, широко используемых в качестве флокулянтов, реагентов для нефтедобычи, диспергаторов, адсорбентов и т. д. Из-за недостатка мономеров подобные поли-

© Максимова А. В., Васильев Д. М., Кузнецова М. В., Демаков В. А., 2012

меры в нашей стране производятся в ограниченных количествах. В результате гидролиза цианопиридинов образуются пиридинзамещенные амиды и карбоновые кислоты, которые являются витаминами, предшественниками фармацевтических препаратов. Никотинамид (витамин В₃, ниацин) используется в медицине как сосудорасширяющее средство для лечения сахарного диабета, заболеваний сердца и желудочно-кишечного тракта. Его применяют в качестве витаминной добавки в рационе питания различных сельскохозяйственных животных. Потребность в таких продуктах в России постоянно возрастает.

В данной работе изучена способность штаммов рода *Rhodococcus* конвертировать акрилонитрил и 3-цианопиридин в соответствующие амиды.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали почвенные штаммы *R. ruber* gt1 и *Rhodococcus* sp. A0, утилизирующие нитрилы карбоновых кислот, полученные ранее (2002—2004 гг.) в результате селекции на ацето- и/или изобутиронитриле из образцов почв и вод естественной среды и почв промышленных предприятий (ФГУП «ПЗ им. С. М. Кирова» и ОАО «Бератон») [8].

Для культивирования бактерий применялась минеральная безазотная солевая среда N (Максимов и др., 2007). В качестве источника углерода использовали глюкозу в концентрации 0.1%, источника азота — хлористый аммоний в концентрации 10 мМ. Ацетамид (10 мМ) добавляли как индуктор нитрилгидратазы. Клетки бактерий выращивали в 600 мл среды в конических колбах объемом 1 л при температуре 30 °С и постоянном перемешивании со скоростью вращения 120 об./мин. Рост культуры бактерий оценивали по оптической плотности суспензии клеток при $\lambda = 540$ нм с учетом разведения. Клетки, отобранные в конце экспоненциальной фазы ($ОП_{540} = 1.5—2.0$) в период максимальной активности, центрифугировали 20 мин. при 9 тыс. об./мин. и ресуспендировали в 10 мМ калий-натрий фосфатном буфере (рН 7.2).

Конверсию нитрилов с использованием биомассы клеток проводили в 1 мл фосфатного буфера в течение 60 мин. Реакцию проводили одновременно в двух температурных режимах: при 25 и 50 °С для акрилонитрила, при 30 и 50 °С для 3-цианопиридина. Субстраты добавляли дробно по мере их трансформации, не превышая концентрацию 3%. Пробы отбирали каждые 10 мин., центрифугировали при 12 тыс. об./мин. в течение 3 мин.

Реакцию останавливали добавлением 50 мкл концентрированной HCl. В 24-часовом синтезе акриламида и никотинамида пробы отбирали каждый час по 200 мкл, центрифугировали при 12 тыс. об./мин. в течение 3 мин., супернатанты использовали для анализа субстратов и продуктов.

Количественный анализ акрилонитрила, акриламида и акриловой кислоты осуществляли методом газовой хроматографии (Shimadzu GC-2014). 3-цианопиридин, никотинамид и никотиновую кислоту определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Shimadzu LC-10). В качестве стандартов использовали растворы чистых нитрилов, амидов и карбоновых кислот.

Активность нитрилгидратазы клеток контролировали спектрофотометрически. Для этого отбирали 0.5 мл суспензии, центрифугировали при 12 тыс. об./мин. в течение 3 мин., ресуспендировали в фосфатном буфере и измеряли ферментативную активность с использованием акрилонитрила. За единицу активности фермента принимали количество акриламида в мкмоль, образуемое мг сухого веса клеток за минуту (мкмоль/мг/мин.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предварительные исследования влияния температуры на каталитическую активность нитрилгидратаз двух штаммов родококков показали, что температурный оптимум функционирования клеток лежит в пределах 30—55 °С (рис. 1).

Принимая удельную активность нитрилгидратазы при конверсии акрилонитрила за 100%, относительная ферментативная активность по 3-цианопиридину составила для штамма *R. ruber* gt1 15.5%, для *Rhodococcus* sp. A0 — 11.3%.

В ходе 60-ти мин. конверсии акрилонитрила установлено, что нитрилгидратазы клеток при 25 °С стабильно работали в течение всего периода исследования. В то же время при 50 °С происходило увеличение активности нитрилгидратазы, которая затем медленно снижалась и к концу реакции составила 58.4% и 44.0% от исходной величины у *R. ruber* gt1 и *Rhodococcus* sp. A0 соответственно (рис. 2).

Хотя к 60-ти мин. активность клеток штаммов *R. ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0 при 50 °С оставалась высокой, накопление акриламида после 30 мин. реакции было незначительное. Количество продукта при конверсии акрилонитрила биомассой *R. ruber* gt1 (0.15 мг сухого веса) при 25 °С составило 678.9 мкмоль, а при 50 °С — 535.5 мкмоль, биомассой *Rhodococcus* sp. A0 (0.2 мг) — 780.5 и

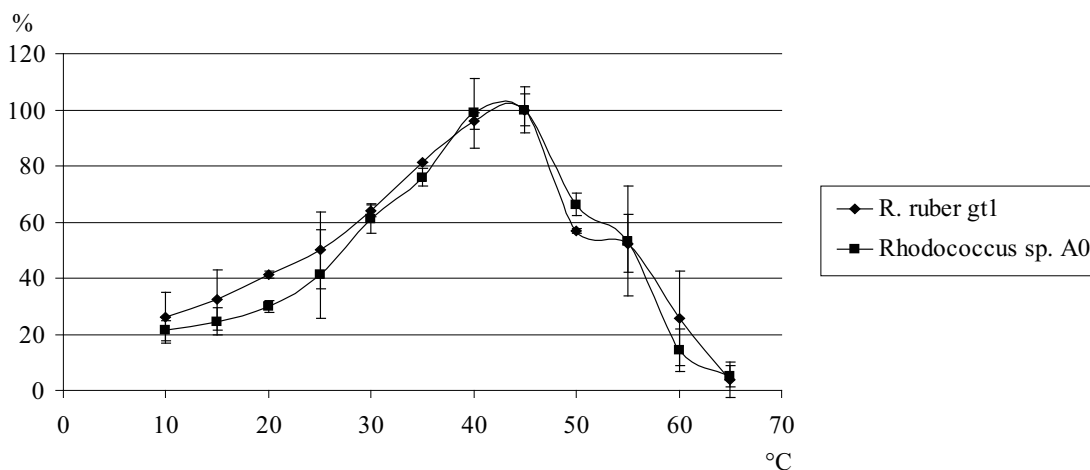


Рис. 1. Температурный оптимум работы нитрилгидратаз штаммов *R. ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0

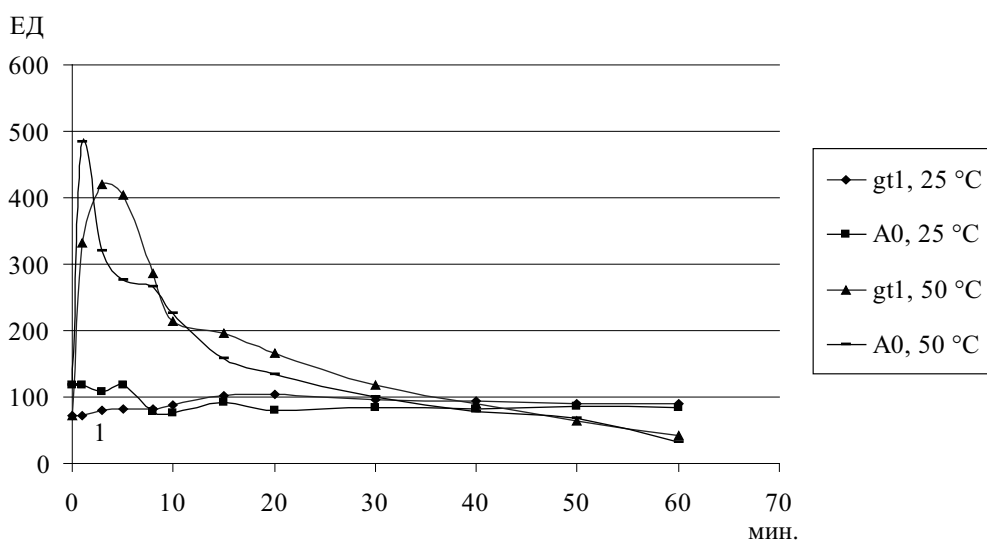


Рис. 2. Активность нитрилгидратаз штаммов *R. ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0 при конверсии акрилонитрила в течение 60 мин.

810 мкмоль соответственно (рис. 3). Динамика ферментативной активности клеток обоих штаммов при конверсии 3-цианопиридина была аналогичной. Количество образованного никотинамида штаммом *R. ruber* gt1 при 30 °C составило 115.7 мкмоль, при 50 °C — 169.6 мкмоль, штаммом *Rhodococcus* sp. A0 — 148.7 и 187.1 мкмоль соответственно.

Учитывая, что к окончанию реакции при 25 °C происходило нарастание обоих продуктов, в последующих экспериментах были увеличены время конверсии и биомасса штаммов. При 24-часовом гидролизе акрилонитрила катализаторами *R. ruber* gt1 (80 мг) и *Rhodococcus* sp. A0 (70 мг) был получен 37.3 и 40.1% раствор акриламида (в 50 мл среды). Основное количество продукта было накоплено к 9 часу реакции. При этом в обоих случаях активность нитрилгидратаз в течение трех

часов держалась на высоком уровне, а затем снижалась и составила менее 10% от исходной активности, что, возможно, связано с токсическим действием накопившегося акриламида, нельзя исключить и влияние акрилонитрила. Акриловая кислота не обнаруживалась.

Биомасса штамма *R. ruber* gt1 (39.0 мг) трансформировала 3-цианопиридин в никотинамид, концентрация которого к концу эксперимента достигла 3.9%. При суточной конверсии нитрила клетками *Rhodococcus* sp. A0 (39.8 мг) концентрация никотинамида в растворе составила 4.2%. Однако нарастание количества продукта не прекратилось и к 24 часам эксперимента, хотя темп прироста никотинамида существенно снизился (рис. 4). Никотиновая кислота определялась в следовых количествах.

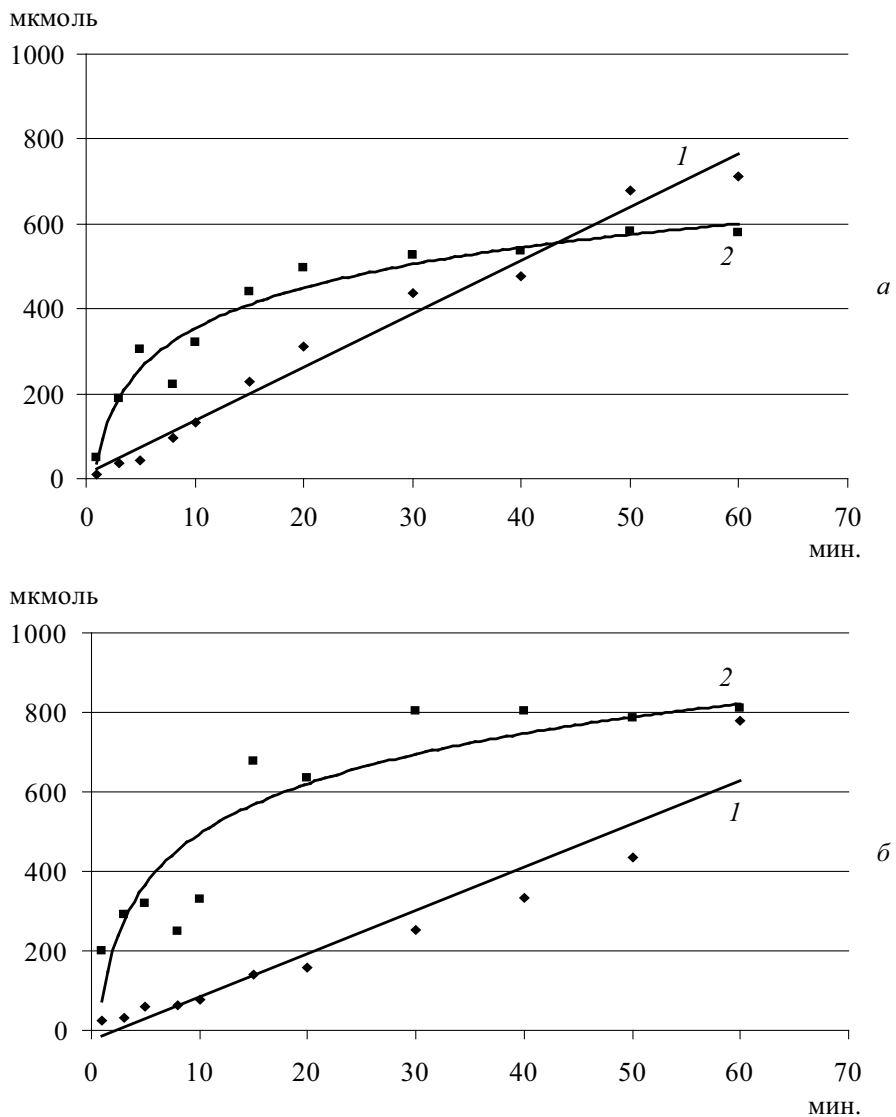


Рис. 3. Динамика образования акриламида при 25 °С (1) и 50 °С (2) штаммами *R. ruber* gt 1 (а) и *Rhodococcus* sp. А0 (б)

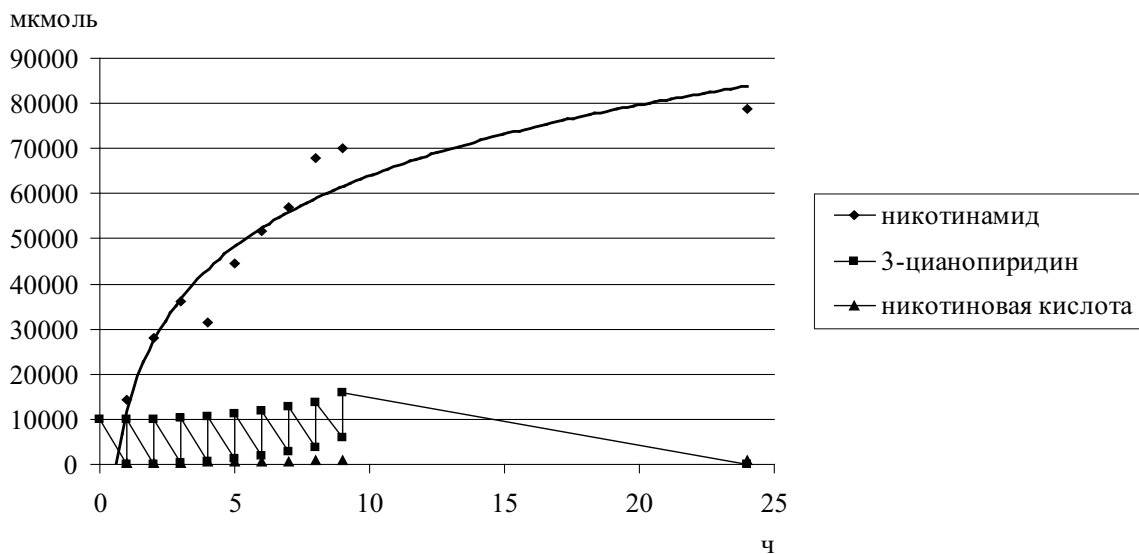


Рис. 4. Динамика трансформации 3-цианопиридина клетками штамма *Rhodococcus* sp. А0

В то же время нужно отметить, что обнаружено значительное накопление никотинамида в клетках обоих штаммов. Отработанную биомассу центрифугировали, 2-хкратно отмывали фосфатным буфером, разрушали ультразвуком, центрифугировали и супернатант использовали для анализа продуктов реакции. Клетки штамма *Rhodococcus* sp. A0 депонировали 8.03 ммоль никотинамида, штамма *R. ruber* gt1 — 28.02 ммоль, что составило 10.1 и 8.9 % от количества продукта в реакционной среде.

Таким образом, температурный режим конверсии 25 °С (для акрилонитрила) и 30 °С (для 3-цианопиридина), дробное добавление субстратов обеспечивают длительную работу ферментов, в результате чего образуется большее количество акриламида и никотинамида без накопления побочных продуктов. Скорость гидратации акрилонитрила и 3-цианопиридина клетками штаммов родококков сопоставима со штаммами *R. rhodochrous* J1 и M33, используемыми в промышленном производстве никотинамида [5, 9]. Получение акриламида и/или никотинамида биокаталитическим способом с помощью штаммов *R. ruber* gt1 и *Rhodococcus* sp. A0 перспективно из-за высокой эффективности, чистоты получаемого продукта, низкими энергетическими затратами.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы, государственный контракт 02.740.11.0078.

Максимова Анна Валерьевна — студент биологического факультета кафедры микробиологии и иммунологии, Пермский государственный университет; e-mail: nuta-max@ya.ru

Васильев Дмитрий Михайлович — аспирант биологического факультета кафедры микробиологии и иммунологии, Пермский государственный университет; e-mail: vasilyevdim@mail.ru

Кузнецова Марина Валентиновна — к.б.н., н.с., Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; e-mail: mar@iegmu.ru

Демаков Виталий Алексеевич — д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией; Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный университет; e-mail: info@iegmu.ru

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яненко А. С. Биосинтез мономеров для полимерной химии / А. С. Яненко // В мире науки. — 2006. — № 8. — С. 78—80.
2. Халгаш Я. Биокатализаторы в органическом синтезе / Я. Халгаш. — М.: Мир, 1991. — 204 с.
3. Kobayashi M. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over / M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada // Trends Bioelectron. — 1992. — Vol. 10. — P. 402—408.
4. Nagasawa T. The superiority of the 3rd generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide / T. Nagasawa, T.S. Shimizu, S.H. Yamada // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — Vol. 40. — P. 189—195.
5. Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1 / T. Nagasawa [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1988. — Vol. 54. — № 7. — P. 1766—1769.
6. Kobayashi M. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology / M. Kobayashi, S. Shimizu // Nat. Biotechnol. — 1998. — Vol. 16. — P. 733—736.
7. Kamble A. Optimization of critical reaction conditions for the production of nicotinamide by nitrile hydratase using response surface methodology / A. Kamble, U.C. Banerjee // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2008. — Vol. 151. — P. 143—150.
8. Биологическое разнообразие нитрилметабализирующих бактерий антропогенно-измененных почв Пермского края / А. Ю. Максимов [и др.] // Экология. — 2007. — № 3. — С. 1—6.
9. Yanenko A. S. Strain of *Rhodococcus rhodochrous* as a producer of nitrile hydratase / A. S. Yanenko [et al.] // Patent US N5827699. 27.10.1998.

Maksimova Anna V. — student of faculty of biology department of microbiology and immunology, Perm State University; e-mail: nuta-max@ya.ru

Vasiliev Dmitriy M. — PhD student faculty of biology department of microbiology and immunology, Perm State University; e-mail: vasilyevdim@mail.ru

Kuznetsova Marina V. — PhD, research scientist Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: mar@iegmu.ru

Demakov Vitaliy A. — doctor of medicine, professor, correspondent member of RSA Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: info@iegmu.ru