

УДК 544.473+577.15+57.088.6+547.27

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АРИЛАЛКИЛЬНЫХ СУЛЬФИДОВ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66

А. А. Елькин^а, Т. И. Кылосова^б, В. В. Гришко^с, И. Б. Ившина^{а,б}

^а Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: info@iegм.ru

^б Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: biodin@psu.ru

^с Институт технической химии УрО РАН, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 3, e-mail: cheminst@mpm.ru

В модельных экспериментах подобраны условия окислительной биотрансформации прохирального фенолметилового сульфида (тиоанизола) в соответствующий (*S*)-сульфоксид (*ee* 82%) с использованием целых клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66. Установлено, что наиболее высокая окислительная активность характерна для клеток родококков, включенных в матрицу поливинилового спирта. Благодаря использованию приема иммобилизации оказалось возможным использовать сульфидные субстраты в концентрациях (1.0–1.5 г/л), токсичных для свободных клеток родококков. Окислительная активность закрепленных бактериальных клеток проявляется в способности их к образованию (*S*)-энантимерно обогащенных фенолметил-, *para*-толилметил-, фенолэтилсульфоксидов и их последующему активному окислению в соответствующие сульфоны.

Ключевые слова: актинобактерии, *Rhodococcus rhodochrous*, целые клетки, биотрансформация, тиоанизол, сульфоксид, иммобилизация, поливиниловый спирт

Введение

Интерес к оптически активным сульфоксидам обусловлен высокой реакционной способностью и возможностью последующего удаления медиаторов, включающих фрагмент RS→O, в реакциях циклоприсоединения, альдольной конденсации, присоединения по Михаэлю и др. (Альфонсов и др., 1998). Данный подход позволяет осуществлять на основе хемо-, регио- и стереоселективных превращений сульфинильных интермедиатов синтез молекул практически любого класса органических соединений. Кроме того, некоторые сульфоксиды проявляют биологическую активность, определяющую полезные свойства таких растений как лук, чеснок, горчица и др. (Fernandez et al, 2003). Среди современных противоязвенных средств к наиболее эффективным блокаторам протонной помпы относится (*S*)-сульфоксид омепразола – эзомепразол (Cotton et al, 2000; Andersson et al, 2001).

Наряду с металлокомплексным катализом для направленного окисления прохиральных органических сульфидов в оптически активные сульфоксиды используют метод биокаталитической трансформации. При этом в качестве катализаторов процесса сульфоксидирования применяются как индивидуальные ферменты, так и целые микробные клетки. Описаны единичные работы (Holland et al, 1992; Porto et al, 2002), в которых

для повышения эффективности процесса окисления прохиральных сульфидов применяется широко используемый в биотехнологии прием иммобилизации целых клеток мицелиальных грибов. Основные проблемы, возникающие в процессе разработки таких биокатализаторов – сохранение жизнеспособности и функциональной активности иммобилизованных клеток микроорганизмов. С этой точки зрения, наиболее эффективным представляется использование криогелей, обеспечивающих проведение иммобилизации бактериальных клеток при физиологических значениях pH, температуры без применения токсичных химических веществ (Лозинский, 1998).

Многие микроорганизмы в природе склонны к образованию агрегированных форм в виде хлопьев и биопленок. Так, среди бактерий выраженной способностью к кооперации отличаются представители рода *Rhodococcus*, самоиммобилизация которых в условиях индуцированного алканотрофного типа метаболизма способствует адаптации микробных клеток к экстремальным условиям обитания. Подобные адаптивные механизмы позволяют эффективно использовать родококки в биотехнологических целях, в том числе в процессах биотрансформации органических соединений (Ившина и др., 2007).

Цель настоящей работы – оценка способности иммобилизованных клеток родококков к окислительной биоконверсии арилалкилсульфидов.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (акроним коллекции ИЭГМ; Каталог штаммов..., 1994; www.iegм.ru/iegмcol).

Биотрансформацию арилалкилсульфидов (0.5–1.5 г/л) свободными и иммобилизованными клетками родококков проводили в минеральной среде следующего состава, г/л: KNO_3 – 1.0; K_2HPO_4 – 1.0; KH_2PO_4 – 1.0; NaCl – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; FeCl_3 – 0.001; дрожжевой экстракт – 0.1%; раствор микроэлементов по Постгейту – 1.0 мл/л; 0.1, 0.5 или 1.0 об.% *n*-гексадекана в качестве источника углерода и энергии. В качестве посевного материала использовали 1 мл 2 сут биомассы родококков ($5.0 \pm 0.4 \times 10^6$ кл/мл), выращенных на мясопептонном агаре и отобранных в экспоненциальной фазе роста, или 200 гранул иммобилизованных клеток ($5.0 \pm 0.6 \times 10^6$ клеток) на 100 мл среды.

В качестве носителя использовали макропористый гетерофазный криогель на основе поливинилового спирта (ПВС). В работе применяли ПВС марки 40/2 (ГОСТ 10779-78) производства ПО «Азот» (Невинномыск, Россия). Иммобилизацию родококков осуществляли путём внесения клеточной суспензии в раствор ПВС согласно методике, описанной в работе (Kuyukina et al, 2006). Перед использованием полученный биокатализатор регидратировали в 0.5% р-ре NaCl в течение 24 ч.

Бактериальные клетки выращивали в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера с объёмом питательной среды 100 мл на орбитальном шейкере Certomat/S (160 об/мин) при 28°C.

Коммерчески доступные фенолметилловый (**Ia**), фенолэтиловый (**Ib**) и *para*-толилметилловый (**Iв**) сульфиды в виде раствора в изопропанол (1:10) добавляли одновременно или через 2 сут культивирования бактериальных клеток. При этом продолжительность процесса биотрансформации родококками составляла 1–12 сут.

Продукты биотрансформации тиаоизола экстрагировали этилацетатом. Объединённые этилаце-

татные вытяжки сушили над сульфатом натрия. Растворитель удаляли в вакууме роторного испарителя «Heidolph» (Германия). Качественный состав продуктов биотрансформации контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах с флуоресцентной добавкой фирмы «Sigma-Aldrich» (США), фиксируя образование продуктов окисления в УФ (254 нм) при сравнении с эталонными сульфидами и соответствующими сульфоксидами, полученными методом химического окисления.

Анализ продуктов биотрансформации осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа Agilent 6890N с кварцевой колонкой HP-5MS SN US 15189741-1 и квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973N в качестве детектора. Оптическое вращение растворов образцов арилалкилсульфоксидов измеряли на поляриметре фирмы «Perkin-Elmer» (США) модель 341 при длине волны 589 нм. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле фирмы «Merck» (США) (0.06–0.20 мм), соотношение вещества и сорбента $\approx 1 : 12$, в качестве элюента использовали смесь гексана с возрастающим от 5 до 40% содержанием этилацетата.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерных программ Excel 2000 и Statistica (версия 6.0 для Windows).

Результаты и их обсуждение

Прием индукции оксигеназных ферментных систем родококков углеводородными субстратами широко используется в процессе биотрансформации органических соединений различных классов, в том числе органических прохиральных сульфидов (Ohta et al, 1984, 1985; Гришко и др. 2000, 2009). Ранее нами было показано (Гришко и др., 2004), что в присутствии 1 об.% *n*-гексадекана свободные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 трансформируют фенолметилловый сульфид (**Ia**) (тиаоизол) в оптически активный (*S*)-сульфоксид (**IIa**) (содержание в сумме продуктов реакции 55%) за 7 сут при условии добавления сульфида через 2-е сут инкубации родококков (рис. 1, 2).

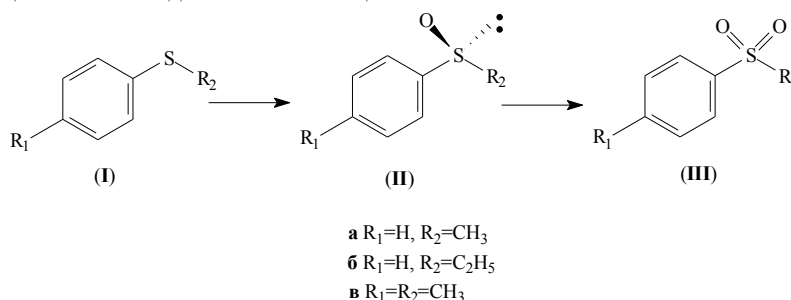


Рис. 1. Биотрансформация арилалкилсульфидов *R. rhodochrous* ИЭГМ 66

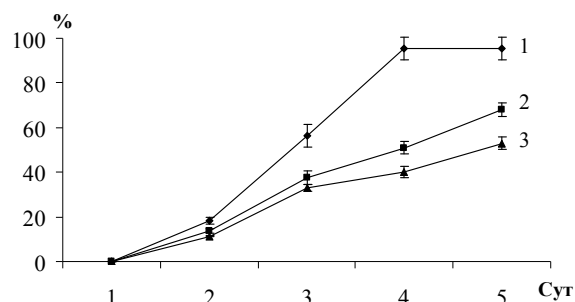


Рис. 2. Биотрансформация тиоанизола (Ia) (0.5 г/л) свободными клетками родококков в присутствии *n*-гексадекана в концентрации, об. %:

1 – 0.1; 2 – 0.5; 3 – 1.0

Установлено, что существенное влияние на каталитическую активность ферментов *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в отношении тиоанизола оказывает концентрация *n*-гексадекана в ростовой среде. Как видно из рис. 2, снижение содержания *n*-гексадекана до 0.5 об. % приводит к увеличению сульфидокисляющей активности родококков и, как следствие, повышению содержания сульфоксида (IIa) до 68% в сумме продуктов биотрансформации. Полная конверсия тиоанизола (Ia) в соответствующий сульфоксид (IIa) достигается в

присутствии 0.1 об. % *n*-гексадекана, что позволяет сократить продолжительность трансформации тиоанизола до 6-ти сут при условии добавления сульфида через 2-е сут инкубации родококков.

В то же время при повышении концентрации тиоанизола биокаталитическая активность родококков заметно ингибируется. Так, при внесении 1.0 или 1.5 г/л тиоанизола уровень биоконверсии сульфида (Ia) составляет не более 25%, при увеличении продолжительности инкубации до 12 сут – не превышает 50%.

Для оптимизации процесса биоконверсии тиоанизола (Ia) использовали прием иммобилизации клеток родококков в криогель на основе ПВС. По данным хромато-масс-спектрометрии, полная биоконверсия тиоанизола (0.5 г/л) в целевой сульфоксид достигается при использовании иммобилизованных бактериальных клеток, предварительно выращенных в присутствии *n*-гексадекана. Установлено, что при использовании гранул биокатализатора, содержащих 0.1 об. % *n*-гексадекана, уже через 1 сут регистрируется образование в среде целевого сульфоксида (IIa) и сульфона (IIIa) тиоанизола в соотношении 3:1 (табл. 1).

Таблица 1

Биотрансформация тиоанизола (Ia) иммобилизованными клетками родококков

Соединение	Содержание в сумме продуктов реакции (%)*								
	А			Б			В		
	1 сут	2 сут	3 сут	1 сут	2 сут	3 сут	1 сут	2 сут	3 сут
Тиоанизол (Ia)	-	-	-	73.6	-	-	94.1	18.0	-
Сульфоксид (IIa)	74.7	34.3	13.3	26.4	55.9	28.3	5.9	78.3	41.2
Сульфон (IIIa)	25.3	65.7	86.7	-	44.1	71.7	-	3.7	58.8

* При концентрации тиоанизола (Ia) в среде: А – 0.5, Б – 1.0, В – 1.5 г/л.

Достигнутая благодаря использованию иммобилизованных клеток интенсификация окислительного процесса позволила использовать более высокие концентрации сульфидного субстрата. По данным хромато-масс-спектрометрии, иммобилизованные клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 при добавлении тиоанизола (Ia) в концентрации 1.0 и 1.5 г/л катализируют активное окисление образующегося сульфоксида (IIa) в сульфон (IIIa) уже в течение первых суток. Как следствие, на момент полного исчезновения тиоанизола через 2-3-е сут концентрация побочного сульфона (IIIa) составляет 44.1 и 58.8 % соответственно (см. табл. 1).

На следующем этапе исследовали ферментативную активность иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в отношении арилалкильных гомологов тиоанизола – фенилэтилового (Iб) и *para*-толилметилового (Iв) сульфидов. Установлено, что родококки при добавлении сульфидов (Iб, Iв) в концентрации 1.5 г/л, как и в модельных экспериментах с тиоанизолом (Ia), катализируют образование соответствующих (S)-

сульфоксидов (IIб, IIв). Однако, показатель оптической чистоты арилалкилсульфоксидов (IIб, IIв) уступает таковому сульфоксида тиоанизола (IIa). Энантиомерный избыток (*ee*) (S)-сульфоксидов (IIб, IIв) составляет 54.7 и 48.0 %, соответственно. Как видно из табл. 2, при окислении арилалкилсульфидов (Ia, Iб, Iв) параллельно с процессом образования сульфоксидов (IIa, IIб, IIв) регистрируется накопление побочных продуктов окисления – сульфонов (IIIa, IIIб, IIIв), сопровождающееся снижением эффективности процесса направленного синтеза целевых сульфоксидов (IIa, IIб, IIв), химический выход которых не превышает 30%. На наш взгляд, решение проблемы ингибирования сульфаноокисляющей активности родококков позволит сместить направление процесса окислительной биотрансформации в сторону направленного образования целевого продукта и повышения его оптической чистоты.

Таблица 2

Биотрансформация арилалкилсульфидов (Ia, Ib, Iv) иммобилизованными клетками родококков

Сульфид	Содержание (%) продуктов биотрансформации			Химический выход (%), ee (%) и $[\alpha]_D(S)$ -сульфоксида (II)
	(I)	(II)	(III)	
Тиоанизол (Ia)	0.0	41.2	58.8	27.5; 82.1; -134 (c 0.4; CHCl ₃)
Фенилэтилсульфид (Ib)	0.0	43.6	56.4	28.4; 54.7; -116 (c 0.3; EtOH)
<i>para</i> -Толилметилсульфид (Iv)	9.8	40.3	49.9	29.6; 48.0; -86 (c 0.4; CHCl ₃)

Заключение

Таким образом, полученные в результате проведенных исследований данные свидетельствуют о значительном повышении сульфидокислительной активности целых клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 при включении их суспензии в ПВС-криогель. Установлено, что использование иммобилизованной формы биокатализатора позволяет осуществить конверсию арилалкилсульфидов в концентрациях (>0.5 г/л), токсичных для свободных клеток родококков, и сократить продолжительность процесса биотрансформации до 3 сут. О высоком окислительном потенциале родококков свидетельствует активность полученного биокатализатора в отношении образующихся в процессе биотрансформации арилалкилсульфоксидов, ингибирование процесса окисления которых в соответствующие сульфоны может способствовать повышению продуктивности процесса образования целевых сульфоксидов.

Работа поддержана грантами Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-64403.2010.4 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Библиографический список

- Гришко, В.В. Биотрансформация изопимаровой и дегидроабетиновой кислот с использованием бактерий рода *Rhodococcus* / В.В. Гришко, А.В. Воробьев, Э.Н. Шмидт // Химия в инт. устойч. развития. 2000. № 8. С. 693–698.
- Гришко, В.В. Биотрансформация тиоанизола актинобактериями *Rhodococcus sensu stricto* / В.В. Гришко, И.Б. Ившина, А.Г. Толстиков // Биотехнология. 2004. № 5. С. 49–56.
- Гришко, В.В. Биокаталитическое получение физиологически активных соединений на основе растительного β -ситостерола / В.В. Гришко, Е.М. Ноговицина, И.Б. Ившина // Кат. в промышл. 2009. № 1. С. 67–74.
- Ившина, И.Б. Адаптационные механизмы выживания алканотрофных родококков, реализованные в неблагоприятных условиях среды / И.Б. Ившина, Т.Н. Каменских, Б.А. Анохин // Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биология. 2007. № 5 (10). С. 107–112.
- Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / под ред. И.Б. Ившиной. М.: Наука, 1994. 163 с.
- Лозинский, В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта // Успехи химии. 1998. Т. 67, № 7. С. 641–652.
- Получение и свойства органических соединений серы / В.А. Альфонсов [и др.]; под ред. Л.И. Беленького. М.: Химия. 1998. 560 с.
- Andersson, T. Pharmacokinetic studies with esomeprazole, the (S)-isomer of omeprazole / T. Andersson, M. Hassan-Alin, G. Hasselgren [et al.] // Clin. Pharmacokinet. 2001. Vol. 40. № 6. P. 411–426.
- Cotton, H. Asymmetric synthesis of esomeprazole / H. Cotton, T. Elebring, M. Larsson [et al.] // Tetrahedron: Asymmetry. 2000. Vol. 11. № 18. P. 3819–3825.
- Fernandez, I. Recent developments in the synthesis and utilization of chiral sulfoxides / I. Fernandez, N. Khair. // Chem. Rev. 2003. Vol. 103. P. 3651–3705.
- Holland, H.L. Effect of cell immobilization and organic solvents on sulfoxidation and steroid hydroxylation by *Mortierella isabellina* / H.L. Holland, S. Poddar, B. Tripet // J. Ind. Microbiol. 1992. Vol. 10. P. 195–197.
- Kuyukina, M.S. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, A.Y. Gavrin [et al.] // J. Microbiol. Methods. 2006. Vol. 65. P. 596–603.
- Ohta, H. Asymmetric synthesis of chiral sulfoxides via microbial oxidation of sulfides / H. Ohta, Y. Okamoto, G. Tsuchihashi // Chem. Lett. 1984. P. 205–208.
- Ohta, H. Microbial oxidation of allylic sulfides to the corresponding optically active sulfoxides / H. Ohta, Y. Okamoto, G. Tsuchihashi // Agric. Biol. Chem. 1985. Vol. 49, № 3. P. 671–676.

Porto, A.L.M. *Aspergillus terreus* CCT 3320 immobilized on chrysotile or cellulose/TiO₂ for sulfide oxidation / A.L.M. Porto, F. Cassiola, S.L.P. Dias

[et al.] // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2002. Vol. 19–20. P. 327–334.

Поступила в редакцию 15.03.2010

Biotransformation of alkyl aryl sulfides by *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66

A. A. Elkin, PhD-student

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 13, Golev str, Perm, Russia, 614081; info@iegm.ru; (342)2446712

T. I. Kylosova, student

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru

V. V. Grishko, candidate of chemistry, head of laboratory

Institute of Technical Chemistry, Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 3, Korolev str, Perm, Russia, 614013; cheminst@mpm.ru

I. B. Ivshina, doctor of biology, professor, correspondent member of RAS

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 13, Golev str, Perm, Russia, 614081; info@iegm.ru

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru

Conditions for oxidative biotransformation of methyl phenyl sulfide (thioanisole) to corresponding (*S*)-sulfoxide (82% ee) by whole cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 were determined in the model experiments. Poly(vinyl) alcohol cryogel-immobilized rhodococci showed higher oxidation activities. As a result, the effective oxidation of thioanisole methyl *p*-tolyl and ethyl phenyl sulfide (1.5 g/l) into optically active (*S*)-sulfoxides after 3-day incubation was achieved using an immobilized biocatalyst.

Key words: actinobacteria; *Rhodococcus rhodochrous*; whole cells; biotransformation; thioanisole; sulfoxide; immobilization; poly(vinyl) alcohol cryogel.

Елькин Андрей Анатольевич, аспирант

ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

Кылосова Татьяна Ивановна, студент

ГОУВПО «Пермский государственный университет»

Гришко Виктория Викторовна, кандидат химических наук, зав. лабораторией

ГУ РАН «Институт технической химии УрО РАН»

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией

ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

ГОУВПО «Пермский государственный университет»