



УДК 577.152.111*110'135: 547.551:542.95

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОКИСЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОВ ДО НИТРОСОЕДИНЕНИЙ

© 1998 г. В. Н. Бурдь*, К.-Х. ван Пе*

Гродненский государственный университет им. Я. Купалы,
230012, Гродно, пер. Доватора, 3/1, Республика Беларусь;
* Институт биохимии, ТУ, Дрезден, ФРГ

Поступила в редакцию 17.12.97 г. Принята к печати 24.02.98 г.

С помощью хлорпероксидазы из *Serratia marcescens* осуществлено окисление 2-хлор-, 3-хлор-, 4-хлоранилина, 2-амино-, 4-аминофенола, *n*-толуидина и 4-аминобензойной кислоты до соответствующих нитросоединений. Реакцию проводили в гомогенной и двухфазной системах с выходом целевых продуктов 5–20 и ~90% соответственно.

Ключевые слова: хлорпероксидаза; *Serratia marcescens*; окисление ферментативное; ариламины; нитросоединения.

Галопероксидазы относятся к группе окислительно-восстановительных ферментов, катализирующих галогенирование органических субстратов в присутствии перекиси водорода [1–3]. Кроме основной реакции, давшей название группе, галопероксидазы катализируют целый ряд синтетически интересных превращений: эпокси-дирование олефинов [4, 5], *N*-деметилирование [6, 7], гидроксильрование ароматических систем [8], окисление сульфидов до сульфоксидов [9, 10], индола до оксоиндола [11], спиртов до альдегидов [12], причем указанные реакции протекают, как правило, с высокой селективностью.

Весьма перспективными для органического синтеза представляются бактериальные гем- и металлнезависимые галопероксидазы. Они обладают высокой активностью при высокой термостойкости и в то же время благодаря успешному клонированию соответствующих генов являются доступными [2, 13–16]. На данный момент известны два примера таких реакций: окисление анилина до нитробензола, катализируемое бромпероксидазой из *Pseudomonas putida* [17], и превращение аминокпирролнитрина в пирролнитрин в присутствии хлорпероксидазы из *P. pyrrocinia* [18].

В настоящей работе исследована возможность ферментативного окисления ряда ароматических аминов (I)–(VII) до соответствующих нитросоединений (VIII)–(XIV) в присутствии хлорпероксидазы (КФ 1.1.1.10) из штамма *Serratia marcescens* [19] (схема 1, таблица).

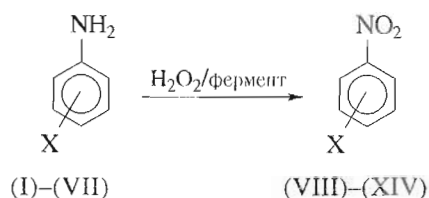
Окисление осуществляли в среде натрий-ацетатного буферного раствора (рН 4.0) при 30°C:

как в гомогенном водном растворе, так и в присутствии органической фазы – этилацетата. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ.

При исследовании механизма галогенирования бактериальными гемнезависимыми галопероксидазами была выдвинута гипотеза участия в процессе каталитической триады Asp-His-Ser [20, 21] и предложена схема действия фермента [2]. На первой стадии реакции в присутствии уксусной кислоты происходит ацетилирование фермента по остатку серина. Полученный эфир, очевидно, устойчив к гидролизу, но разлагается перекисью водорода с образованием надуксусной кислоты. При взаимодействии последней с бромид- или хлорид-ионом образуется гипогалогенид, который и является непосредственным галогенирующим реагентом [2]. Образованием надуксусной кислоты в реакционной смеси может быть объяснено также окисление ароматических аминов до нитропроизводных, описываемое нами в настоящей работе (схема 2).

Как видно из данных таблицы, окисление в гомогенной системе осуществляется с невысоким выходом нитросоединений. Окисление аминов (V)–(VI), содержащих электронодонорные группы, протекает достаточно легко с образованием, по данным ВЭЖХ, побочных веществ – возможно, продуктов более глубокого окисления. Заметно труднее происходит окисление хлоранилинов (I)–(III) при некотором возрастании выхода соответствующих нитробензолов (VIII)–(X). Увеличение времени реакции выше значений, указанных в таблице, повышает степень превращения исходных аминов, однако содержание нитропроизводных в реакционной смеси при этом снижается.

* Автор для переписки (e-mail: burd@univer.belpak.grodno.by).



X = 2-Cl (I), (VIII); 3-Cl (II), (IX); 4-Cl (III), (X);
4-CH₃ (IV)–(XI); 2-OH (V), (XII); 4-OH (VI), (XIII);
4-COOH (VII), (XIV).

Схема 1.

Введение в систему органического растворителя, экстрагирующего образующееся нитропроизводное, позволяет в ряде случаев значительно увеличить выход целевого продукта. Активность фермента как в гомогенной, так и в двухфазной системах сохранялась стабильной в течение нескольких суток.

Таким образом, проведенное исследование показало, что хлорпероксидаза из *S. marcescens* может служить катализатором для препаративного окисления ароматических аминов до соответствующих нитросоединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе фирмы Pharmacia-LKB, снабженном УФ-детектором. Обратенно-фазовую хроматографию проводили на колонке C₁₈ (4.6 × 125 мм) в системе метанол–вода (70 : 30) или метанол–вода–уксусная кислота (100 : 99 : 1).

Ферментный препарат хлорпероксидазы [13]. Биомассу *S. marcescens*, выращенную в течение 3 сут при 30°C на среде, содержащей глюкозу (10 г/л), пептон (10 г/л) и хлорид натрия (5 г/л), су-

спендировали в 0.1 М растворе ацетата натрия (рН 5.5) и обрабатывали ультразвуком при 4°C в течение 20 мин с периодом в 30 с. Гомогенат центрифугировали (18000g, 20 мин, 4°C) и супернатант подвергали очистке методом частичной денатурации (50°C, 20 мин). После отделения денатурированных белков центрифугированием фермент осаждали сульфатом аммония. Далее использовали фракцию 55-80% насыщения. Осадок растворяли в 0.1 М растворе ацетата натрия (рН 6.2) и диализовали против 0.01 М раствора той же соли. Дальнейшую очистку фермента осуществляли с помощью колоночной хроматографии вначале на DEAE-сефадексе (элюент – градиент 0.1–1.0 М хлорид натрия в 0.01 М растворе ацетата натрия, рН 6.2), а затем гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (элюент – 0.1 М раствор ацетата натрия, рН 5.5).

Бромирующую активность фермента определяли спектрофотометрически при 290 нм с монохлордимедоном (48 мкМ), перекисью водорода (8.8 мМ), бромидом калия (100 мМ) и азидом натрия (10 мМ) в среде 1 М ацетата натрия (рН 5.5) [22]. Реакцию инициировали добавлением раствора фермента. Используемый в работе препарат фермента имел активность 2.3 мкмоль/мл мин.

Окисление аминов (I)–(VII). К 870 мкл реакционной смеси, содержащей амин (2 мМ) и перекись водорода (5 мМ) в среде 1 М ацетата натрия (рН 4.0), добавляли 130 мкл ферментного препарата. В случае двухфазного окисления приливали дополнительно 500 мкл этилацетата. Смесь при постоянном перемешивании инкубировали при 30°C. Содержание соединений (I)–(XIV) в смеси определяли методом ВЭЖХ. После отбора про-

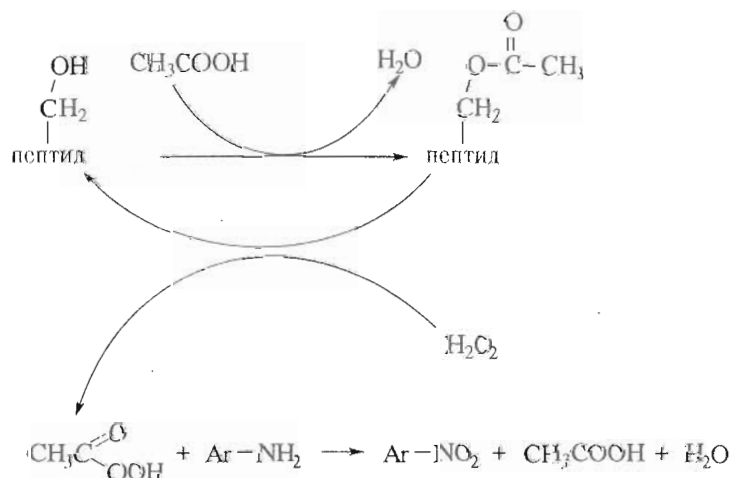
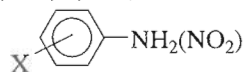


Схема 2.

Выход нитросоединений (VIII)–(XIV) и степени превращений исходных аминов (I)–(VII) в условиях гомогенного и двухфазного окисления



Превращение	X	Гомогенная система			Двухфазная система		
		Время инкубации, ч	Выход нитропроизводного, %	Превращение амина, %	Время инкубации, ч	Выход нитропроизводного, %	Превращение амина, %
(I) → (VIII)	2-Cl	47	20	42	303	90	100
(II) → (IX)	3-Cl	22	10	37	207	81	82
(III) → (X)	4-Cl	22	17	34	207	87	87
(IV) → (XI)	4-COOH	30	17	77	96	29	90
(V) → (XII)	4-CH ₃	20	12	98	140	18	100
(VI) → (XIII)	2-OH	20	5	100	–	–	–
(VII) → (XIV)	4-OHV	20	6	100	–	–	–

бы фермент инактивировали добавлением диметилсульфоксида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neidleman S.L., Geigert J.* Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications. Chichester, UK: Ellis Horwood, 1986.
2. *Van Pee K.-H.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 375–399.
3. *Бурдь В.Н., ван Пе К.-Х., Лингенс Ф., Воскобоев А.И.* // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. С. 1002–1006.
4. *Geigert J., Terry D.L., Demetrios J.D., Hirano D.S., Neidleman S.L.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 136. P. 778–782.
5. *Allain E.J., Hager L.P., Deng L., Jacobsen E.N.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 4415–4416.
6. *Kedderis G.L., Koop D.R., Hollenberg P.F.* // *J. Biol. Chem.* V. 255. P. 10174–10182.
7. *Kedderis G.L., Hollenberg P.F.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. V. 233. P. 315–321.
8. *Miller P.V., Tschirret-Guth R.A., Montellano P.R.O.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 319. P. 333–340.
9. *Colonna S., Gaggero N., Manfredi A.* // *Biochem. J.* 1990. V. 29. P. 10465–10468.
10. *Colonna S., Gaggero N., Casella L., Carrea G., Pasta P.* // *Tetrahedron: Asymmetry.* 1992. V. 3. P. 95–106.
11. *Corbett M.D., Chipko B.R.* // *Biochem. J.* 1979. V. 183. P. 269–276.
12. *Geigert J., Demetrios J.D., Neidleman S.L., Lee T.D., Wadsworth J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 114. P. 1104–1108.
13. *Wolffram C., Lingens F., Mutzel R., van Pee K.-H.* // *Gene.* 1993. V. 130. P. 131–135.
14. *Bantleon R., Altenbuchner J., van Pee K.-H.* // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 2339–2347.
15. *Pfeifer O., Pelletier I., Altenbuchner J., van Pee K.-H.* // *J. Gen. Microbiol.* 1992. V. 138. P. 1123–1131.
16. *Pelletier I., Pfeifer O., Altenbuchner J., van Pee K.-H.* // *Microbiology.* 1994. V. 140. P. 509–516.
17. *Itoh N., Morinaga N., Kouzai T.* // *Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 29. P. 785–791.
18. *Kirner S., van Pee K.-H.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994. V. 33. P. 352.
19. *Burd W., Yourkevich O., Voskoboev A.I., van Pee K.-H.* // *FEMS Microbiol. Letters.* 1995. V. 129. P. 255–260.
20. *Pelletier I., Altenbuchner J., Mattes R.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1250. P. 149–157.
21. *Hecht H.J., Sobek H., Haag T., Pfeifer O., van Pee K.-H.* // *Nature Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 532–537.
22. *Hager L.P., Morris D.R., Brown F.S., Eberwein H.* // *J. Biol. Chem.* 1966. V. 241. P. 1769–1777.

Enzymic Oxidation of Arylamines into Nitroarenes

V. N. Burd^{*#} and K.-H. van Pee^{**}

^{*} *Kupala State University, per. Dovatora 3/1, Grodno, 230012 Belarus*

^{**} *Institute of Biochemistry, Technical University, Dresden, Germany*

2-Chloroaniline, 3-chloroaniline, 4-chloroaniline, 2-aminophenol, 4-aminophenol, *p*-toluidine, and 4-aminobenzoic acid were oxidized into corresponding nitroarenes with chloroperoxidase from *Serratia marcescens*. The reaction was performed in a homogeneous or biphasic system and yielded 5–20 or ~90% of the reaction products, respectively.

Key words: chloroperoxidase, *Serratia marcescens*, enzymic oxidation, arylamines, nitroarenes

[#] *To whom correspondence should be addressed; e-mail: burd@univer.belpak.grodno.by.*