

УДК 579.695

М. Ю. Коротаев^a, Е. В. Вихарева^a, И. Б. Ившина^{b,c}

^a Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия

^b Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^c Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

МЕЛАНИЗАЦИЯ ПОЛИАМИНОФЕНОЛОВ В ПРОЦЕССЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛА КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCUS RUBER* ИЭГМ 77

Методами ¹³C ЯМР-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии установлено, что в составе нерастворимых в воде продуктов, образующихся в процессе биотрансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77, присутствуют производные индола и бензофурана. Предложен механизм образования сопряженных индольных и бензофурановых циклических систем в результате последовательной ферментативной окислительной поликонденсации аминофенольных соединений. Образующиеся полиаминофенолы преобразуются в меланиноподобные соединения. По нашим данным, молекулы полиаминофенолов, а также индольные и бензофурановые фрагменты в химической структуре меланиноподобных соединений содержат симметричные (“Sym”) и асимметрические (“Asym”) участки, включающие ароматические и хиноидные кольца с эквивалентными заместителями в *para*- и *meta*-положении соответственно. Впервые обоснованная возможность ферментативной меланизации полиаминофенолов клетками *R. ruber* ИЭГМ 77 рассматривается с позиции гипотезы гумификации.

Ключевые слова: парацетамол; биотрансформация; актинобактерии рода *Rhodococcus*; хромато-масс-спектрометрия; ¹³C ЯМР-спектроскопия.

М. Yu. Korotaev^a, E. V. Vikhareva^a, I. B. Ivshina^{b,c}

^a Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^c Perm State University, Perm, Russian Federation

POLYAMINOPHENOL MELANIZATION IN THE PROCESS OF PARACETAMOL BIOTRANSFORMATION BY *RHODOCOCCUS RUBER* ИЭГМ 77

Precipitate formed in the process of paracetamol biotransformation by *Rhodococcus ruber* IEGM 77 was found to include indole and benzofuran ring fragments using ¹³C NMR spectroscopy and chromatography-mass-spectrometry methods. Mechanisms of the formation of conjugated indole and benzofuran cyclic systems resulting from the fermentative condensation of polyaminophenols contained in the precipitate chemical structure have been proposed. According to our data, polyaminophenol molecules and indole and benzofuran fragments in chemical structure of melanin-like compounds contain symmetric (“Sym”) and asymmetric (“Asym”) sites comprising aromatic and quinoid rings with equivalent substituents in *para*- and *ortho*- positions, respectively. Originally substantiated possibility of enzyme melanization of polyaminophenols by *R. ruber* IEGM 77 cells is viewed from the perspective of humification hypothesis.

Key words: paracetamol; biotransformation; *Rhodococcus*; chromatography-mass-spectrometry; ¹³C NMR spectroscopy.

Введение

Биологическая деструкция лежит в основе биотехнологических способов утилизации органических, в том числе фармацевтических, отходов [Wu, Zhang, Chen, 2012]. В качестве биодеструкторов широко ис-

пользуются почвенные микроорганизмы, выделяемые из природных сред [De Gusseme et al., 2011; Zhang et al., 2013]. Наряду с этим биодеструкция органических соединений является естественным процессом, протекающим в природе при трансформации растительных остатков в гуминовые вещества. Последние представляют собой смесь высокомолекулярных азотсодер-

жащих соединений ароматической и алифатической природы.

Согласно данным, представленным в работе F.J. Stevenson [1994], одним из механизмов образования гуминовых веществ является ферментативная окислительная поликонденсация хиноидных соединений с аминокислотами. Наличие азометиновых связей в химической структуре гумусовых кислот подтверждает данный механизм [Орлов, 1990]. Однако процессы гумусообразования не исчерпываются одними только химическими взаимодействиями карбонильных и аминогрупп реагирующих соединений, иначе в качестве продуктов реакции идентифицировались бы только производные полиаминофенолов и полифеноксазинов, последние из которых присутствуют в молекулах гуминовых кислот [Орлов, 1990; Thorn, Mikita, 1992]. Отличительной особенностью гумификации является образование как азот-углеродных, так и углерод-углеродных полимеробразующих связей [Орлов, 1990]. Следовательно, биохимическое взаимодействие хинонов с соединениями, содержащими аминогруппу, гипотетически может привести к синтезу индольного кольца, представленного в молекулах гуминовых кислот и родственных им меланинов [Орлов, 1990; Thorn, Mikita, 1992; Bosetto et al. 1997; Subianto, 2006]. Последние являются продуктами полимеризации индол-5,6-хинона и 5,6-дигидроксииндол-2-карбоновой кислоты, образующихся при окислении тирозина и триптофана.

В ранее проведенных нами исследованиях показано, что биодеструкция парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 сопровождается образованием черного аморфного осадка полимерной природы [Коротаев и др., 2015]. В соответствии с данными элементного анализа, спектрофотометрии, ИК- и ^{13}C ЯМР-спектроскопии продукты, содержащиеся в полученном осадке, представляют собой полиаминофенолы, структурные единицы которых включают остатки 2,5-диаминобензол-1,4-диола, 4,6-диаминобензол-1,3-диола, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинондиимина, 2-амино-5-гидрокси-1,4-бензохинонимина [Коротаев и др., 2016]. Однако данные методы не позволили получить информацию о характере углерод-углеродных связей в образующихся нерастворимых продуктах (НП) биотрансформации парацетамола. Для установления в структуре НП полимеробразующих углерод-углеродных химических связей и более детального выяснения механизмов биотрансформации парацетамола родококками с позиций общей теории гумификации целесообразно исследование данного осадка методами ^{13}C ЯМР спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Целью настоящей работы является оценка возможности биосинтеза меланин-родственных соединений (меланизации

образующихся полиаминофенолов) при биотрансформации парацетамола клетками *R. ruber* ИЭГМ 77.

Материалы и методы исследований

Для биодеструкции парацетамола (Аньцю Луань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай) использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 77 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур WDCM 768, www.iegmc.org.ru). Выделение осадка из постферментационной среды осуществляли в соответствии с условиями, описанными в работе [Ivshina et al., 2006].

Спектроскопия ЯМР ^{13}C

Спектры ^{13}C ЯМР НП записывали в ДМСО- d_6 на спектрометре ЯМР Bruker DRX-500 (Bruker BioSpin GmbH, Германия) с рабочей частотой 125.8 МГц. Химические сдвиги представляли относительно Me_4Si .

Хромато-масс-спектрометрия

Для анализа использовали пробы, представляющие собой (1:12,78)=1/(1+12.78) = 7.3% (масс.) растворы НП в этилацетате. Хроматограммы и масс-спектры НП снимали на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975C на капиллярной неполярной колонке HP-5ms (Agilent Technologies, США). Условия анализа: ионизация методом электронного удара (70 eV); объем вводимой пробы – 1 мкл; скорость потока газа-носителя (гелий) – 1 мл/мин.; без деления потока; температура испарителя – 280°C; температура колонки программируемая (в течение первых 5 мин 70°C, затем повышение до 310°C со скоростью 18°C в 1 мин. и выдерживание на данном уровне 10 мин.); диапазон анализируемых масс – 40–400 m/z; задержка работы детектора на выход растворителя – 3.5 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные спектры ^{13}C ЯМР НП подтверждают наличие в НП полиаминофенольных и феноксазиновых фрагментов и свидетельствуют о присутствии индольных и бензофураноидных циклических систем (рис. 1, 2): 92.98 (C_1 , C_1); 93.92 (C_2 , C_2); 94.53 (C_3 , C_3); 115.61 ($\text{C}_{1,2}$), 115.64 ($\text{C}_{1,2,3}$); 124.63, 125.02, 125.41 (C–N); 150.75, 154.63, 154.86, 155.39 (C–O); 148.37, 161.47 (C=N); 177.34 (C=O).

Результаты хромато-масс-спектрометрического исследования растворов НП в этилацетате пред-

ставлены на рис. 3 и 4.

На хроматограмме (рис. 3) отмечается выраженный пик со временем удерживания 22.60 мин с масс-спектром (рис. 4), включающим следующие характеристические ионы, m/z (%): 41.00 (23.03); 55.00 (9.56); 57.20 (100.00); 91.00 (10.31); 117.00 (5.10); 131.20 (5.93); 147.20 (10.69); 191.20 (12.37); 316.40 (33.94). Идентифицировать по библиотеке масс-спектров данное соединение не удалось. Тем не менее, гипотетические структурные фрагменты, установленные методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии (см. рис. 2), объясняют механизм фрагментации компонента НП со временем удерживания 22.60 мин. (рис. 5).

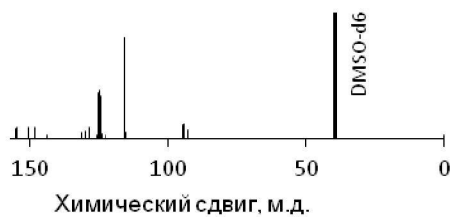


Рис. 1. Спектр ^{13}C ЯМР НП (DMSO- d_6 , 125.8 МГц):

39.64, 39.80, 92.98, 93.92, 94.53, 115.35, 115.40, 115.61, 115.64, 122.78, 124.12, 124.63, 124.87, 125.02, 125.41, 125.76, 128.64, 129.81, 131.12, 143.80, 148.37, 150.75, 154.63, 154.86, 155.39, 161.47, 177.34, 178.89

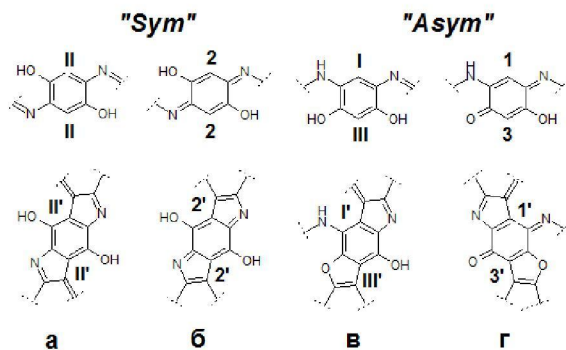


Рис. 2. Структурные фрагменты молекул НП, представленные остатками:

а – 2,5-диаминобензол-1,4-диола; **б** – 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинондиимина; **в** – 4,6-диаминобензол-1,3-диола; **г** – 2-амино-5-гидрокси-1,4-бензохинонимина

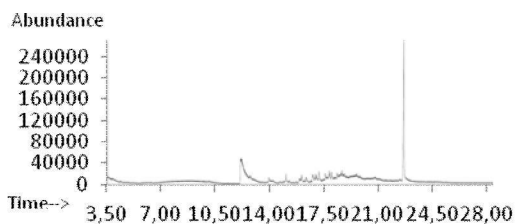


Рис. 3. Хроматограмма раствора НП в этилацетате

Как видно из рис. 5, характеристические ионы в масс-спектре компонента НП со временем удерживания 22.60 мин. являются продуктами фрагментации конденсированной системы, состоящей из индольных колец. В соответствии с данными, представленными в работах [Коротаев и др., 2016; Ivshina et al., 2006], биотрансформация парацетамола родококками осуществляется по пути I и II, при реализации которых образуются асимметричные ("Asym") и симметричные ("Sym") участки молекул полиаминофенолов **Iг** и **IIг** соответственно (рис. 6).

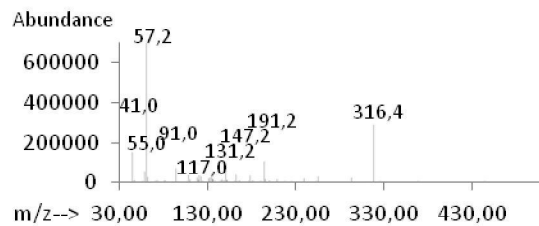


Рис. 4. Масс-спектр компонента НП со временем удерживания 22.60 мин.

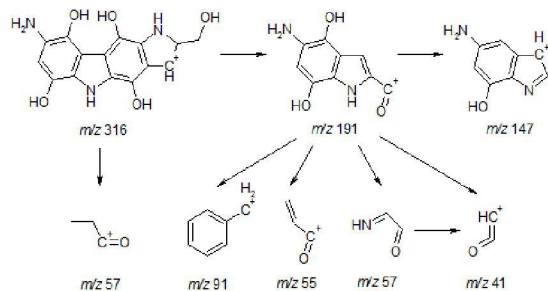


Рис. 5. Фрагментация и характеристические ионы компонента НП со временем удерживания 22.60 мин.

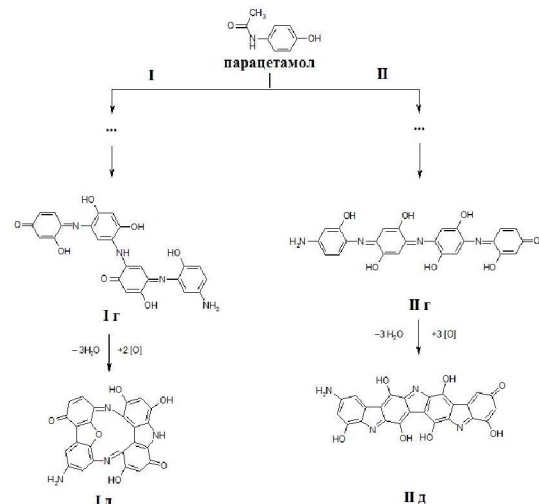


Рис. 6. Предполагаемая схема меланизации полиаминофенолов (путь I и II)

Вероятно, в процессе дальнейшей биотрансформации родококками "Asym" и "Sym" участки молекул полиаминофенолов подвергаются меланизации с образованием полииндолобензофурановых

и полииндольных циклических конденсированных систем соответственно.

Впервые обоснованную нами возможность ферментативной меланизации полиаминофенолов клетками *R. ruber* ИЭГМ 77, по-видимому, можно рассматривать с позиции образования гуминоподобных веществ (гумификации).

Заключение

Молекулы продуктов, получаемых при биологической трансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77, включают аминифенольные и феноксазиновые, а также индольные и бензофурановые фрагменты. Таким образом, данные продукты имеют гуминоподобную природу и образуются в результате ферментативной меланизации полиаминофенолов.

Работа выполнена при частичной поддержке Комплексной программы Уральского отделения РАН (проект 15-12-4-10) и гранта Российского научного фонда (14-14-00643).

Библиографический список

- Коротаев М.Ю. и др. Химическая структура осадка, образующегося в процессе биотрансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 // *Биофармацевтический журнал*. 2016. Т. 8, № 1. С. 13–19.
- Коротаев М.Ю. и др. Определение средней молекулярной массы нерастворимых продуктов биодеструкции парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2, Ч. 26. С. 5850–5854.
- Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 325 с.
- Bosetto M. et al. Study of the humic-like compounds formed from L-tyrosine on homoionic clays // *Clays Minerals*. 1997. Vol. 32. P. 341–349.
- De Gussemе B. et al. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor // *Water Research*. 2011. Vol. 45. P. 1829–1837.
- Ivshina I.B. et al. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006. Vol. 42, № 4. P. 392–395.
- Stevenson F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.
- Subianto S. *Electrochemical Synthesis of Melanin-Like Polyindolequinone*. Thesis of dissertation. Brisbane St Lucia: The University of Queensland, 2006. 197 p.
- Thorn K.A., Mikita M.A. Ammonia fixation by humic substances: a nitrogen-15 and carbon-13 NMR study // *The Science of the Total Environment*. 1992. Vol. 113. P. 67–87.
- Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms // *The Science of the Total Environment*. 1992. Vol. 113. P. 67–87.
- Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms // *Applied Microbiology Biotechnology*. 2012. Vol. 96. P. 875–884.
- Zhang L. et al. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97, № 8. P. 3687–3698.

References

- Korotaev M.Yu., Polyakova E.B., Vikhareva E.V., Rychkova M.I. [Chemical structure and biological activity of precipitate formed in the process of paracetamol biotransformation with *Rhodococcus ruber* IEGM 77]. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal* (Moscow). V. 8, N. 1 (2016): pp. 13–19. (In Russ.).
- Korotaev M.Yu., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. [Determination of the mean molecular weights of insoluble products formed during paracetamol biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 77]. *Fundamental'nye issledovaniya* (Moscow). N. 2 (2015): pp. 5850–5854. (In Russ.).
- Orlov D.S. *Humusovye kisloty pochv i obshchaya teoriya gumifikatsii* [Humic substances of soils and general theory of humification]. Moscow, MSU Publ., 1990. 325 p. (In Russ.).
- Bosetto M., Arfaioli P., Pantani O.L., Ristori G.G. Study of the humic-like compounds formed from L-tyrosine on homoionic clays. *Clays Minerals*. V. 32 (1997): pp. 341–349.
- De Gussemе B., Vanhaecke L., Verstraete W., Boon N. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Research*. V. 45 (2011): pp. 1829–1837.
- Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci. *Applied Biochemistry and Microbiology*. V. 42, N. 4 (2006). pp. 392–395.
- Stevenson F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.
- Subianto S. *Electrochemical Synthesis of Melanin-Like Polyindolequinone*. Thesis of dissertation. Brisbane St Lucia: The University of Queensland, 2006. 197 p.
- Thorn K.A., Mikita M.A. Ammonia fixation by humic substances: a nitrogen-15 and carbon-13 NMR study. *The Science of the Total Environment*. V. 113 (1992): pp. 67–87.
- Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms

Applied Microbiology Biotechnology. V. 96 (2012): pp. 875–884.

Zhang L., Hu J., Zhu R., Zhou Q., Chen J. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied Microbiology*

and Biotechnology. V. 97, N. 8 (2013): pp 3687–3698.

Поступила в редакцию 10.03.2016

Об авторах

Коротаев Михаил Юрьевич, аспирант кафедры аналитической химии
Пермская государственная фармацевтическая академия
614990, Пермь, ул. Полевая, 2;
mikhail5555@mail.ru; (342)2825856

Вихарева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии
Пермская государственная фармацевтическая академия
614990, Пермь, ул. Полевая, 2;
vikhareva@pfa.ru; (342)2825856

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; ivshina@iegm.ru; (342)2808114

профессор кафедры микробиологии и иммунологии
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

About the authors

Korotaev Mikhail Yur'evich, postgraduate, Analytical Chemistry department
Perm State Pharmaceutical Academy. 2, Poleyaya str., Perm, Russia, 614990; mikhail5555@mail.ru; +7(342)2825856

Vikhareva Elena Vladimirovna, Doctor of pharmacy, Professor, Head of Analytical Chemistry department
Perm State Pharmaceutical Academy. 2, Poleyaya str., Perm, Russia, 614990; vikhareva@pfa.ru; +7(342)2825856

Ivshina Irina Borisovna, Doctor of biology, Corresponding member of RAS, Head of Alkanotrophic Microorganism laboratory
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; ivshina@iegm.ru; +7(342)2808114
Professor of the department Microbiology and Immunology
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990