

Л. В. Модянова, М. Р. Дудучава, Н. Ф. Пискункова, Г. В. Гришина,
П. Б. Терентьев, И. А. Паршиков

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПИПЕРИДЕИНА И ПИРИДИНА

При микробиологической трансформации 1-метил-2-(N-фенилкарбамоилоксиметил)пиперидеина-3 растущей культурой гриба *C. verticillata* ВКПМ F-430 получен оптически активный 2-(4-гидроксифенилкарбамоилоксиметил)пиперидеин-3. Трансформация 2-(2-фенилэтил)пиридина метанооксиляющей культурой *Methylococcus* в зависимости от условий проведения процесса протекает путем как гидроксирования боковой цепи, так и превращения субстрата в N-оксид.

В последние годы внимание синтетиков и фармакологов привлекают производные пиридина и пиперидина, содержащие в гетерокольце и(или) в боковой цепи гидроксильные группы [1—3]. Ранее было показано, что некоторые культуры мицелиальных грибов способны гидроксировать гетероциклические атомы углерода производных пиперидина [4], пиперидеина [5], ряда бициклических производных пиперидина [6, 7], а также атомы углерода боковой цепи алкилпиридинов [8].

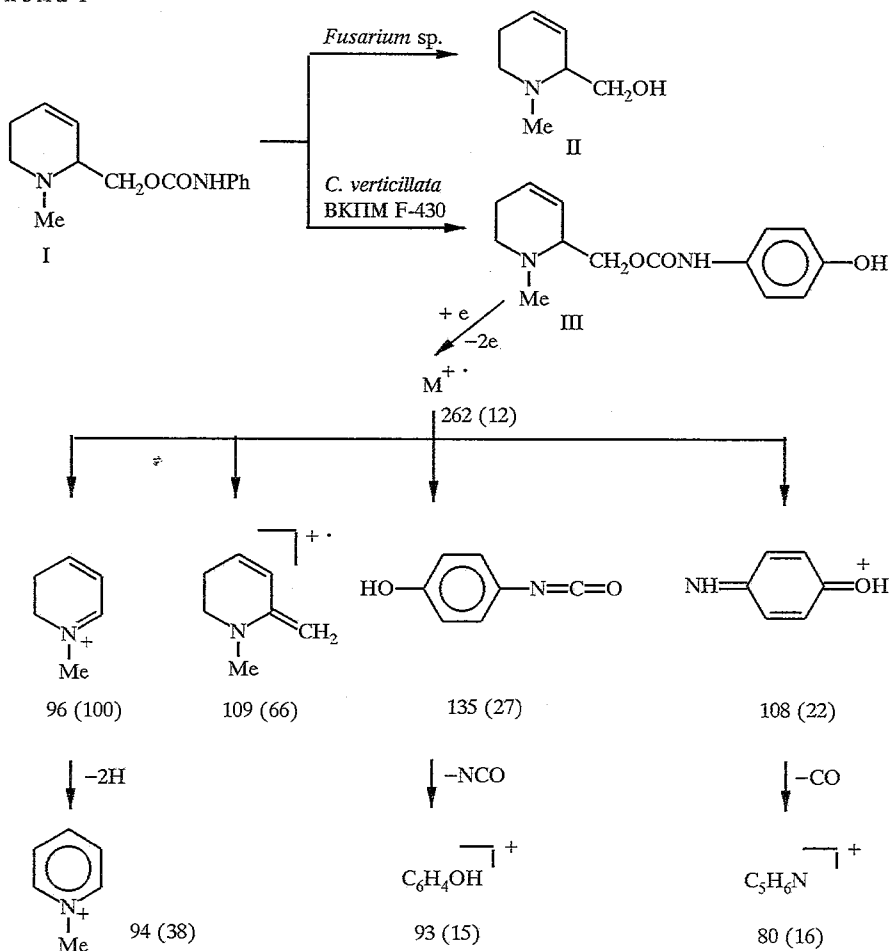
Объектами исследования служили некоторые штаммы бактерий и мицелиальных грибов, полученные из коллекций микроорганизмов России и США.

При исследовании возможности микробиологического окисления фенилуретана — 1-метил-2-(N-фенилкарбамоилоксиметил)пиперидеина-3 (I) штаммами грибов: *C. verticillata* ВКПМ F-430, *B. bassiana* ВКМ F-3111Д, *B. bassiana* ATCC 7159, *A. niger* ВКМ F-1119, *A. niger* KM-11, *A. niger* NRRL 3228, *F. culmorum*, *F. solani*, *F. sporotrichiela* var. *poal*, *F. moniliforma*, *F. microcera* var. *orthoconium*, *F. oxysporum*, *F. kuhnii*, *F. heterosporium* и *F. averaceum* var. *herbarum* было установлено, что все штаммы грибов *Beauveria bassiana* и *Aspergillus niger* оказались неактивными по отношению к этому субстрату. Все грибы из рода *Fusarium* осуществляли лишь гидролиз карбамоильной группы и в инкубационной смеси, по данным хромато-масс-спектрометрии, присутствовал только исходный субстрат I и метил-2-гидроксиметилпиперидеин-3 (II). И только при трансформации данного субстрата штаммом *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 из реакционной смеси с выходом 50% удалось выделить оптически активный продукт трансформации, которому на основании анализа его спектральных данных была приписана структура 2-(4-гидроксифенилкарбамоилоксиметил)пиперидеина-3 (III) (схема 1). В его ИК спектре появились две новые (по сравнению со спектром соединения I) широкие полосы поглощения в области 3680...3280 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям связанной водородной связью и свободной гидроксильной группы. В масс-спектре этого соединения наблюдался пик молекулярного иона с массой 262 (на 16 единиц больше, чем у исходного соединения I), что указывало на присутствие в составе продукта реакции III еще одного атома кислорода. Анализ процессов распада молекулярного иона подтвердил предположение о присутствии атома кислорода в бензольной части молекулы (см. схему 1).

Действительно, наличие в масс-спектре интенсивных пиков ионов* 96 и 109, характерных и для масс-спектра исходного уретана I, доказывало

* Здесь и далее для пиков ионов даны величины *m/z*.

Схема 1

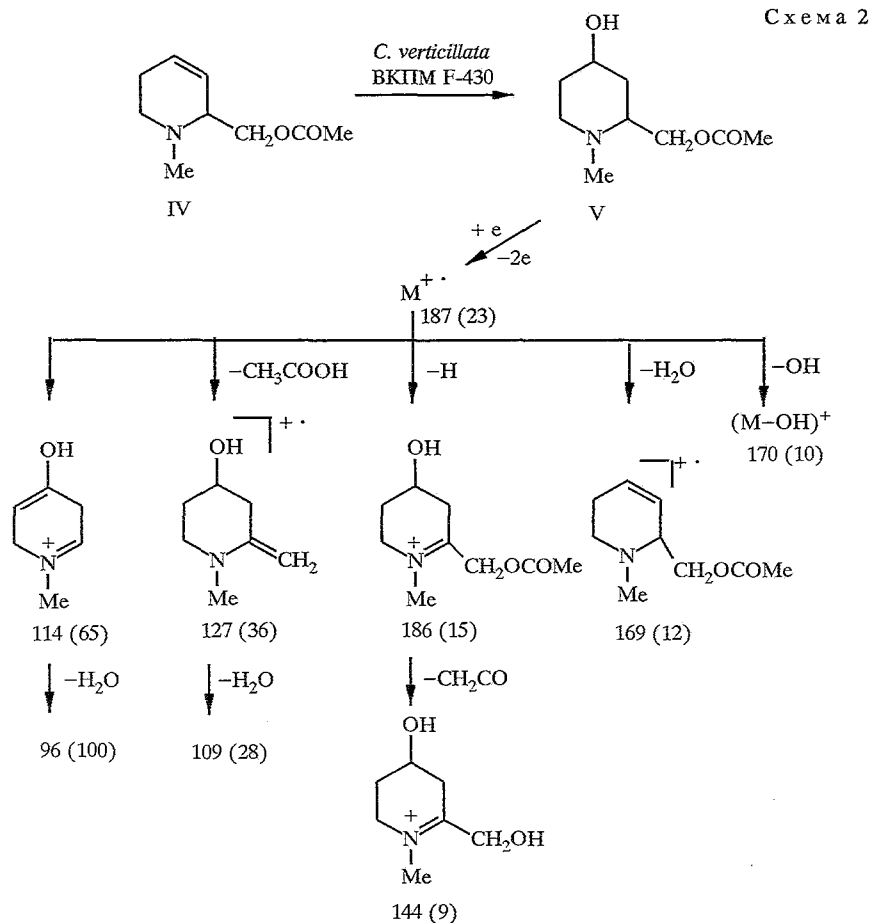


отсутствие изменений в строении пиперидеиновой части молекулы. Напротив, если для масс-спектра соединения I было характерно наличие интенсивного пика иона фенилизотиоцианата (119), то в масс-спектре соединения III пик этого иона отсутствовал, но появился пик иона 135.

В спектре ПМР соединения III помимо трехпротонного синглета метильной группы в положении 1 (2,15), дублета двух протонов группы $\text{CH}_2\text{—O}$ (4,2) и мультиплета пяти алициклических протонов гетероцикла в положениях 2, 5 и 6 наблюдались два однопротонных мультиплета при 5,3 и 6,2 м. д., свидетельствующих о сохранении кратной связи. Та же картина спектра ПМР была характерна и для соединения I, однако характер сигналов в области более слабых полей в спектре соединения III различался. Вместо мультиплета пяти протонов (соединение I) наблюдались два двухпротонных дублета при 6,75 и 7,15 м. д., что указывало на *para*-замещение. Кроме того, помимо уширенного сигнала протона группы N—H (7,2) появился аналогичный сигнал при 7,4 м. д., который можно объяснить наличием фенольного гидроксила. Аналогичный процесс гидроксирования карбамойльной части молекулы был отмечен ранее [9].

Замена фенилкарбамойльной группы на ацетильную исключила возможность гидроксирования боковой цепи. Однако все использованные культуры не трансформировали 2-ацетоксиметил-1-метилпиперидеин-3 (IV), за исключением *C. verticillata* ВКПМ F-430, которая в незначительной степени осуществляла гидратацию этого субстрата (схема 2), поскольку при хромато-масс-спектральном анализе хлороформенного экстракта получен-

ной культуральной жидкости на хроматограмме помимо пика исходного неизмененного субстрата (время удерживания 8'45'', мол. масса 169) присутствовал пик соединения V (11'28''), площадь которого составляла 1/10 площади пика соединения IV.



В масс-спектре соединения V помимо пика молекулярного иона (187) наблюдались пики ионов 170 (M-OH) и 169 (M-H₂O), что указывало на гидратацию субстрата при трансформации. Присутствие в спектре пика иона 114 доказывало, что гидроксигруппа находится в гетерокольце. На схеме 2 представлены процессы образования этих и ряда других наиболее важных для установления структуры ионов, что позволяет с большой долей вероятности подтвердить строение полученного соединения.

К сожалению, выделить соединение V в индивидуальном виде нам не удалось. Наблюдавшегося ранее образования продуктов дигидроксилирования кратной связи производных пиперидина [5] культурой *C. verticillata* VKPM F-430 в случае соединений I и IV не зафиксировано.

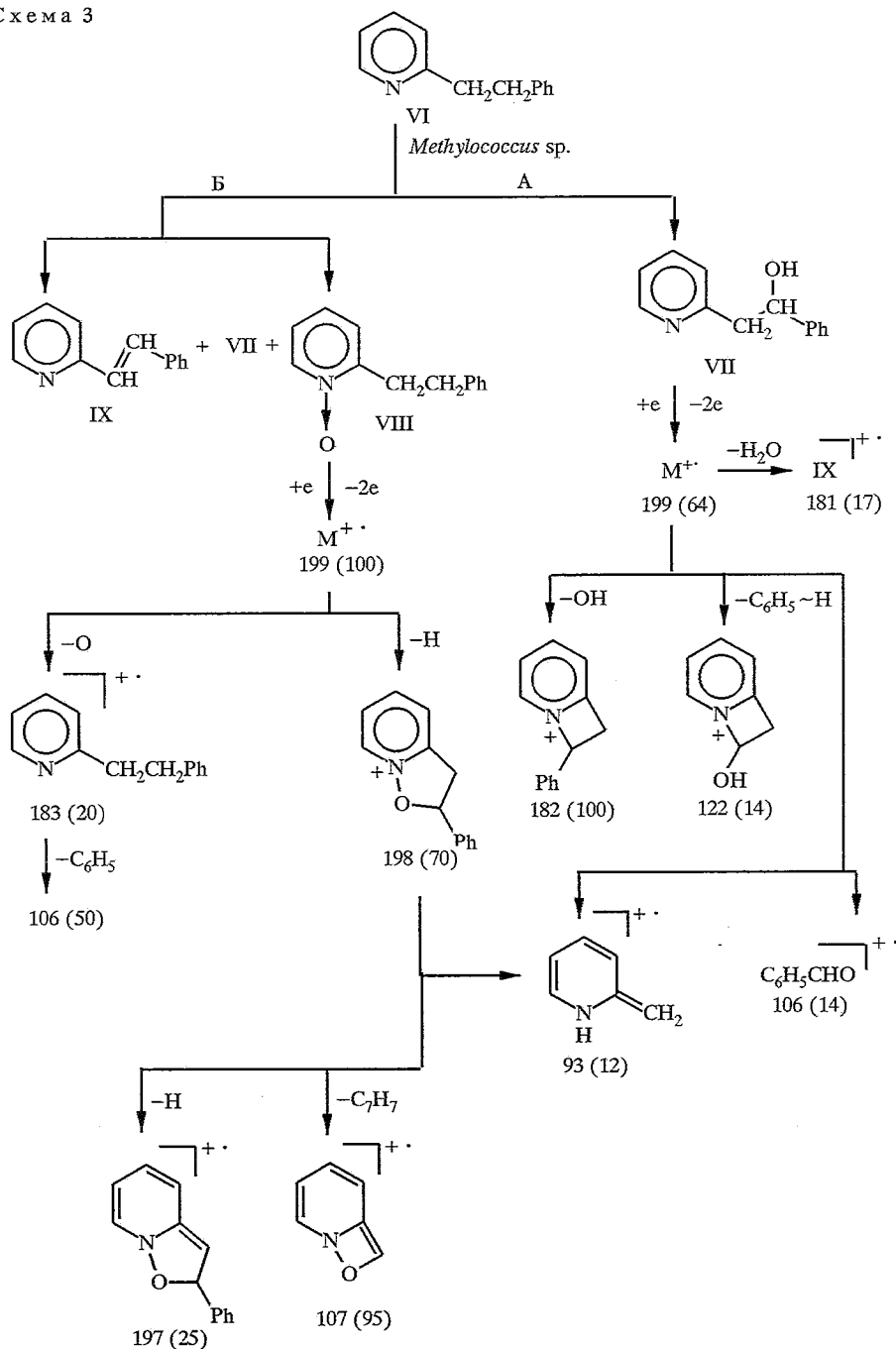
Ранее мы показали, что культуры грибов *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Aspergillus terreus* и *Penicillium pusillum* способны с разной степенью селективности гидроксилировать «бензильное» положение изомерных 2- и 3-этилпиридинов [10], тогда как клетки *Nocardia*, *Arthrobacter* и ряда других микроорганизмов в условиях соокисления превращают 3-метилпиридин сразу в никотиновую кислоту [11].

В поисках культур микроорганизмов, способных селективно гидроксилировать положение 2 (по отношению к пиридиновому циклу) этильного фрагмента 2-(2-фенилэтил)пиридина (VI), мы изучили трансформацию

этого соединения смешанной метанооксиляющей культурой *Methylococcus*, известной своей высокой гидроксигирующей способностью в отношении углеводов [12]. Процесс осуществляли в двух вариантах: А — суспензией неразмножающихся клеток, Б — растущей культурой в условиях соокисления.

В первом случае из культуральной жидкости методом препаративной ТСХ (R_f 0,25) с выходом 40% было выделено одно вещество, которому на основании анализа его спектральных данных была приписана структура 2-(2-гидрокси-2-фенилэтил)пиридина (VII) (схема 3).

Схема 3



Во втором случае также методом ТСХ из хлороформенного экстракта культуральной жидкости были выделены примерно с равными выходами (около 5 %) соединения VII (R_f 0,25) и VIII (R_f 0,6). В ИК спектре первого из них присутствовала широкая полоса поглощения в области 3150...3500 см^{-1} , характерная для связанной водородной связью гидроксильной группы, тогда как в таком же спектре второго соединения эта полоса отсутствовала, но присутствовал интенсивный пик при 1250 см^{-1} , что позволяло предположить наличие N-оксидной группировки [13]. В масс-спектрах обоих соединений наблюдались пики молекулярных ионов с одинаковым массовым числом 199, однако характеры их распадов резко различались. В случае соединения VII молекулярный ион эффективно элиминировал гидроксил, фенольную группу (схема 3) или же претерпевал расщепление по связи C—C с миграцией атома водорода и образованием ионов с 106 и 93. Для процесса диссоциативной ионизации соединения VIII (схема 3) наиболее специфичной была потеря его высокостабильным молекулярным ионом атомарного кислорода или же одного или двух атомов водорода. В случае соединения VIII процесс является характерным для N-оксидов азинов, тогда как для случая с соединением VII известно, что подобные процессы неоднократно отмечались ранее при фрагментации молекулярных ионов 2-арил- и арилалкилпиридинов [13]. Хромато-масс-спектральный анализ того же хлороформенного экстракта показал наличие в нем помимо исходного субстрата VI ($t_{\text{уд}} = 6'25''$), спирта VII ($15'07''$), N-оксида VIII ($12'43''$) и стильбазола IX ($9'39''$) с соотношением площадей хроматографических пиков 29 : 9 : 8 : 1 соответственно. Полученные масс-спектры соединений VII и VIII совпадали с описанными выше, а масс-спектры соединений VI и IX были идентичны опубликованным в литературе [13,14].

Таким образом, процессы микробиологического гидроксирования пиперидеинов-3, а также арилалкилпиридинов очень чувствительны как к наличию новых заместителей в молекуле, так и к условиям культивирования микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы грибов *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, *Beauveria bassiana* ВКМ F-3111Д были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ АН РФ, а штаммы *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 и *Rhizopus oryzae* ВКПМ F-431 — из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ВНИИГенетики, два штамма грибов *Aspergillus niger* КМ-11 и *Penicillium simplicissimum* КМ-16 — из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, девять видов гриба рода *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. solani*, *F. sporotrichiella* var. *poal*, *F. moniliforma*, *F. microcera* var. *orthoconium*, *F. oxysporum*, *F. kuhni*, *F. heterosporium* и *F. averaceum* var. *herbarum*) были предоставлены кафедрой низших растений биологического факультета МГУ. Штамм *Aspergillus niger* NRRL 3228 был получен из коллекции Северных региональных исследовательских лабораторий США, гриб *Beauveria bassiana* ATCC 7159 — из Американской коллекции типовых культур. Биомасса смешанной культуры метанокисляющих бактерий из рода *Methylococcus* была получена из ВНИИ биосинтеза белковых веществ (ВНИИ ББВ) России.

Субстраты для трансформации: 1-метил-2-(N-фенилкарбамоилоксиметил)пиперидин-3 (I) и 2-ацетоксиметил-1-метилпиперидин-3 (IV) синтезированы на химическом факультете МГУ, 2-(2-фенилэтил)пиридин (VI) был любезно предоставлен нам профессором Л. Д. Смирновым.

УФ спектры измерены на спектрофотометре Cary 219 (Varian) в этаноле. Спектры ПМР зарегистрированы на приборе BS-467 (Tesla), рабочая частота 60 МГц, в ДМСО- D_6 , внутренний стандарт ТМС. Масс-спектры получены на масс-спектрометрах МХ-1321А и М-25 (Cratos) при энергии ионизации 70 эВ с вводом вещества в ионный источник или через хроматограф. Удельное вращение измеряли на спектрополяриметре Perkin-Elmer 141. Хроматографическое разделение продуктов трансформации осуществляли на пластинках Kieselgel 60-F 254 (Merck; 0,25 мм) в системах растворителей: петролейный эфир—этилацетат, 1 : 1 (N1); гексан—этилацетат—этанол, 10 : 10 : 2 (N2).

1-Метил-2-(N-фенилкарбамоилоксиметил)пиперидеин-3 (I) получают в смеси с его Δ^4 -изомером взаимодействием фенилизоцианата со смесью 1-метил-2-гидроксиметилпиперидеинов-3 и -4 и выделяют в индивидуальном виде (масло) методом высокоэффективной колоночной флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя системой растворителей N1. R_f 0,37. ИК спектр: 1730 (C=O), 3200, 3330 cm^{-1} (N—H). Спектр ПМР: 2,10 (2H, м, 5-CH₂); 2,38 (3H, с, N—CH₃); 2,67 (2H, м, 6-CH₂); 2,80 (1H, м, 2-CH); 3,57 (2H, д, 2'-CH₂); 5,52 (1H, м, 4-CH); 5,89 (1H, д, д, 3-CH); 6,75...7,25 м. д. (5H, м, C₆H₅). При анализе методом ВЭЖХ (прибор Милихром, УФ детектор, длина волны 220 нм) время удерживания 1'45". Масс-спектр (I, %): 246(1), 119(34), 109(12), 96(100), 94(10), 93(13), 77(4), 66(3), 65(5).

Все исследованные штаммы мицелиальных грибов поддерживают на твердой среде следующего состава (г/л): глюкоза 10,0; кукурузный экстракт 20,0; агар 20,0; вода водопроводная, pH среды 5,0.

Для выращивания грибов и проведения реакции трансформации используют жидкую среду следующего состава (г/л): глюкоза 20,0; кукурузный экстракт 10,0; пептон 5,0; KН₂РO₄ 5,0; вода водопроводная; pH 5,0. Культуры микроскопических грибов инкубируют на агаризованной среде 10...14 сут (до обильного спороношения) при 28 °С. Затем делают смыв с поверхности среды, добавляя 5 мл стерильной водопроводной воды, и инокулят переносят в колбы объемом 750 мл, содержащие по 100 мл жидкой среды.

Грибы выращивают в течение 24 ч на круговой качалке (200...220 об/мин) при 28 °С и полученную биомассу используют в качестве посевного материала, который вносят в среду в количестве 5% (объемных). Далее микроскопические грибы выращивают также на круговой качалке в течение 96 ч в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды, внося через 24 ч трансформируемый субстрат 300 мг/л (растворенный в 3 мл этанола). Плотность сырой биомассы клеток составляет 30,0...33,0 г/л.

При трансформации неразмножающимися клетками *Methylococcus* биомассу, полученную из ВНИИ ББВ, ресуспандируют в 1000 мл фосфатного буфера (0,01 моль/л, pH 7,0). Плотность сырой биомассы клеток в буфере около 30 г/л. К суспензии клеток в буфере добавляют трансформируемый субстрат в концентрации 50 мг/л, после чего реакцию смесь инкубируют на качалке в течение 24...28 ч при 40 °С в колбах на 750 мл (100 мл смеси в каждой колбе).

Трансформацию бактериями из рода *Methylococcus* в условиях соокисления осуществляют в 7 колбах объемом 750 мл, для проведения процесса трансформации используют 600 мл фосфатного буфера (0,01 моль/л, pH 7,2), к которому добавляют живые клетки (полученные из ВНИИ ББВ) из расчета 30...35 мг/л и 420 мг субстрата (60 мг растворенные в 2 мл спирта, в каждую колбу). Через колбы с реакционной смесью в течение 20...25 с пропускают ток магистрального газа, после чего их герметично закрывают пробками и встряхивают на круговой качалке 24 ч при 37...39 °С.

По окончании процесса трансформации клетки бактерий отделяют центрифугированием, а биомассу грибов отфильтровывают через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтраты подщелачивают до pH 7,5, экстрагируют горячим хлороформом в течение 30 ч (в экстракторах для тяжелых жидкостей), экстракты упаривают досуха в вакууме, растворяют в 0,5 мл метанола и анализируют методом ГХ-МС или ТСХ с последующим выделением продуктов трансформации хроматографическими методами.

При трансформации 50 мг 1-метил-2-(N-фенилкарбамоилоксиметил)пиперидеин-3 (I) штаммом *Fusarium* выделяют 25 мг масла (R_f 0,37), при хромато-масс-спектральном анализе которого на хроматограмме обнаружено только два пика (соотношение площадей 1 : 3). Первый из них соответствует соединению II ($t_{уд} = 3'27''$), масс-спектр: 127(55)M⁺, 126(22) (M—H), 109(18) (M—H₂O), 96(100) (M—CH₂OH), 94(17) (M—CH₂OH—H₂), 84 (M—C₂H₅N), 66(12) (M—H₂O—C₂H₅N). Второе соединение ($t_{уд} = 11'27''$) — исходный субстрат I (масс-спектр см. выше).

После трансформации 100 мг соединения I штаммом *S. verticillata* ВКПМ F-430 при хроматографическом разделении полученного экстракта (система N1) выделяют два соединения: исходный субстрат I (R_f 0,37) в количестве 34 и 53 мг (50%) соединения III в виде масла (R_f 0,28) (ИК, ПМР и масс-спектры приведены выше), $[\alpha]_D^{20}$ (-) 6,50° (с 1,85; этанол).

При трансформации 50 мг соединения VI неразмножающимися клетками культуры *Methylococcus* из хлороформенного экстракта хроматографически (система N2) выделяют 20 мг (37%) соединения VII в виде масла (R_f 0,25), УФ спектр (метанол): λ_{max} 216, 262 нм (ИК и масс-спектры см. выше).

При трансформации 420 мг соединения VI тем же штаммом, но в условиях соокисления из органического экстракта получают 230 мг масла, из которого методом ТСХ (система N2) были

выделены два продукта трансформации: 20 мг вещества VII (R_f 0,25; λ_{\max} 216 и 262 нм) и 18 мг вещества VIII (R_f 0,6; λ_{\max} 257 и 268 нм). Данные ИК, масс- и хромато-масс-спектрометрии приведены выше.

Приносим глубокую благодарность профессору Р. Фурстосу (Университет Медитеррани, факультет науки Лумини, Франция) за ценные советы и замечания, сделанные в процессе написания этой работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 97-03-33177а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang D., Hansen E. B., jr., Deck J., Heinze T. M., Sutherland J. B., Cerniglia C. E. // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — Vol. 62. — P. 3477.
2. Kim D.-K., Kim G., Kim Y.-W. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. — 1996. — N 6. — P. 803.
3. Tilford Ch. H., Shelton R. S., Van Campen M. G. // J. Amer. Chem. Soc. — 1948. — Vol. 70. — P. 4001.
4. Паршиков И. А., Модянова Л. В., Довгилевич Е. В., Терентьев П. Б., Воробьева Л. И., Гришина Г. В. // ХГС. — 1992. — № 2. — С. 195.
5. Терентьев П. Б., Паршиков И. А., Гришина Г. В., Пискунова Н. Ф., Чумаков Т. И., Булахов Г. А. // ХГС. — 1997. — № 5. — С. 711.
6. Furstoss R., Archelas A., Waegel B. // Tetrah. Lett. — 1981. — Vol. 22. — P. 445.
7. Furstoss R., Archelas A., Waegel B. // Tetrah. Lett. — 1980. — Vol. 21. — P. 451.
8. Воробьева Л. И., Паршикова И. А., Дорре М., Довгилевич Е. В., Модянова Л. В., Терентьев П. Б., Никшиова Н. Г. // Биотехнология. — 1990. — № 4. — С. 24.
9. Vigne B., Archelas A., Furstoss R. // Tetrahedron. — 1991. — Vol. 47. — P. 1447.
10. Паршиков И. А., Терентьев П. Б., Модянова Л. В. // ХГС. — 1994. — № 11/12. — С. 1510.
11. А. с. 228688 СССР / Головлева Л. А., Скрябин Г. К., Кост А. Н., Терентьев П. Б. // Б. И. — 1968. — № 32. — С. 14.
12. Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. — М.: МГУ, 1983. — 172 с.
13. Терентьев П. Б., Станкявичус А. П. Масс-спектрометрия биологически активных азотистых оснований. — Вильнюс: Мокслас, 1987. — 220 с.
14. Атлас масс-спектров органических соединений. — Новосибирск, 1981. — Вып. 7. — 209 с.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва 119899, Россия
e-mail: petr@ms.bioorg.chem.msu.su

Поступило в редакцию 06.04.98