

Селективное окисление газообразных углеводов бактерияльными клетками

Г.А.Коваленко

*Институт катализа им. К.Г.Борескова Сибирского отделения Российской академии наук
630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 5, факс (383–2) 35–5766*

Представлен обзор работ по прямому селективному окислению газообразных алканов C_1 – C_4 и алкенов C_2 – C_4 в ценные оксипродукты (спирты, метилкетоны, эпоксиды) с помощью бактерияльных клеток газоассимилирующих микроорганизмов. Покоящиеся бактерияльные клетки микроорганизмов, выращенных на газообразных углеводородах, обладают ферментативной монооксигеназной активностью: они способствуют внедрению атома кислорода в молекулу углеводорода с образованием оксипродукта. Этот процесс осуществляется в очень мягких условиях, характеризуется высокой селективностью и стереоспецифичностью, протекает без образования токсичных побочных продуктов. Рассмотрены некоторые проблемы практической реализации окислительных биокаталитических процессов, а именно регенерации кофактора монооксигеназы, уменьшения токсического действия образовавшегося оксипродукта, а также иммобилизации клеток на твердых носителях с целью получения активного и стабильного гетерогенного биокатализатора для прямого парциального окисления углеводородов. Библиография — 111 ссылок.

Оглавление

I. Введение	676
II. Сравнительная характеристика процессов прямого селективного окисления газообразных углеводородов	677
III. Микроорганизмы — биокатализаторы прямого парциального окисления газообразных углеводородов	677
IV. Микробиологическое эпоксидирование низших олефинов	683
V. Микробиологическое гидроксигирование газообразных алканов	686
VI. Заключение	689

I. Введение

В последние годы значительно возрос интерес к получению химических соединений — продуктов тяжелого органического синтеза — методами биотехнологии и биокатализа. Такие малоэнергоёмкие, экологически чистые процессы являются реальной альтернативой химическому синтезу и поэтому они интенсивно исследуются и разрабатываются во всех индустриально развитых странах. По некоторым прогнозам¹ к концу 90-х годов 10–20% химических продуктов будет производиться биотехнологическим способом. Особенно интересным с химической точки зрения является биохимический процесс прямого селективного окисления предельных и непредельных углеводородов в ценные оксипродукты: хиральные эпоксиды, спирты, метилкетоны, дикарбоновые кислоты.

Окислительная биотрансформация органических соединений, в том числе углеводородного сырья, занимает одно из ведущих мест среди промышленных биокаталитических процессов. Целенаправленные исследования в этой области

проводят крупные химические компании Японии («Nippon Mining Co.», «Nitto Chem. Ind.»), Америки («EXXON», «Dow Chem.», «Monsanto», «Du Pont»), Западной Европы («Hoechst», «Bayer», «BASF»), а также университеты Западной Европы (Wageningen Agricultural University, The Netherlands). Наиболее интересным является процесс получения оптических изомеров эпоксидов непредельных углеводородов (описаны свойства 31 эпоксида), реализованный японской фирмой «Nippon Mining Co.» в полупромышленном масштабе, с использованием суспензионных культур микроорганизмов рода *Nocardia*.^{2,3} При микробиологическом эпоксидировании цепей умеренной длины выход *R*-1,2-эпоксидов составляет 80% при оптической чистоте 80–90%.^{2,3} Полученные оптические эпоксиды применяются в тонком органическом синтезе при производстве лекарств, биологически активных веществ, жидких кристаллов для электроники. Экспертные оценки показывают, что биотехнологические способы получения оптических изомеров эпоксидов могут составить конкуренцию химическим. Например, ежегодная прибыль от сбыта «биотехнологического» оксида пропилена может достигнуть 2–3 млрд. долларов США.¹

В данном обзоре рассматриваются биокаталитические подходы к решению проблем прямого парциального окисления газообразных предельных и непредельных углеводородов (метана, этана, этилена, пропана, пропилена, бутана, бутилена) в ценные оксипродукты (эпоксиды, спирты, метилкетоны). В качестве биокатализаторов этих процессов используют бактерияльные клетки, обладающие необходимой ферментативной оксигеназной активностью, в иммобилизованном состоянии, а также в виде суспензий покоящихся (нерастущих) микроорганизмов. В обзоре будут кратко

Г.А.Коваленко. Кандидат химических наук, руководитель группы по биокатализу ИК СО РАН. Телефон (383–2) 35–7789.

Область научных интересов: биокатализ ферментами и бактерияльными клетками метанассимилирующих микроорганизмов, иммобилизация ферментов и микробных клеток на неорганических носителях.

Дата поступления 15 февраля 1996 г.

описаны характерные особенности микроорганизмов, использующих для своего роста газообразные углеводороды, и внутриклеточные ферментативные системы, катализирующие реакции окислительной биотрансформации газообразных углеводородов. Особое внимание будет уделено гетерогенным биокатализаторам на основе иммобилизованных бактериальных клеток для окислительной биотрансформации пропилена в 1,2-эпоксипропан.

II. Сравнительная характеристика процессов прямого селективного окисления газообразных углеводородов

Процессы селективного окисления легких газообразных углеводородов в ценные оксипродукты являются ключевыми этапами химической переработки газа и нефти. Некоторые из этих процессов, в частности прямое селективное эпоксидирование этилена, реализованы в промышленном масштабе, другие, например прямое парциальное окисление газообразных алканов (метана, этана, пропана) в ценные оксипродукты (спирты, альдегиды), находятся в стадии интенсивных лабораторных исследований. Анализ литературных данных по селективному окислению углеводородов $C_1 - C_4$ показывает, что широко используемые в данных процессах гетерогенные катализаторы оксидной природы обладают достаточно ограниченными возможностями: максимальная селективность образования целевого продукта (80–95%) достигается только при малых степенях превращения исходного углеводорода (не более 5%).^{4–6} Чтобы достичь селективности до 70% при конверсии выше 5%, либо применяют в качестве окислителя геммоксид азота,^{5,7} либо используют катализаторы, содержащие драгоценные металлы (золото, палладий, рутений).⁸ Литературные данные по прямому селективному окислению этана и пропана в спирты, альдегиды или метилкетоны очень отрывочны и немногочисленны. Основным продуктом окисления этана является метанол в смеси с этанолом,⁵ а при окислении пропана образуется преимущественно акриловая кислота.^{9,10}

Биокаталитические процессы привлекают внимание исследователей своими уникальными особенностями: малой энергоемкостью, обусловленной мягкими условиями протекания реакций (температура не выше 40°C), селективностью, близкой к 100% независимо от степени превращения исходного субстрата, а также стереоспецифичностью, обеспечивающей образование хиральных соединений. Кроме того, из-за отсутствия токсических побочных продуктов биокаталитические процессы являются экологически чистыми и безопасными для окружающей среды.

Данные, приведенные в табл. 1 и 2, демонстрируют возможности биокатализа на примерах эпоксидирования пропилена и гидроксирования метана кислородом газовой фазы. По основным параметрам (активность, выход продуктов) биокатализаторы находятся на уровне лучших гетерогенных катализаторов химической природы или превосходят их. В обзорах^{19–21} анализируются перспективы окислительной биотрансформации углеводородов в ценные оксипродукты и рассматривается возможность практической реализации такого процесса в условиях химического производства. Единственным существенным недостатком биотехнологических процессов является низкая концентрация в реакционной среде (как правило, водной) конечных продуктов. Она не превышает нескольких десятков миллимоль в одном литре, в связи с чем возникают проблемы выделения целевых веществ. Аналогичные проблемы существуют и в гетерогенном катализе при малых степенях превращения исходного соединения. Их можно решить, например, подбором подходящей конструкции реактора или использованием двухфазной реакционной среды для экстракции и концентрирования конечного оксипродукта.

Таблица 1. Сравнительная характеристика процессов прямого парциального окисления пропилена в 1,2-эпоксипропан молекулярным кислородом.

Характеристики	Химический гетерогенный процесс ¹¹	Биокаталитический процесс ^{12–14}
Температура, °C	450–550	20–40
Конверсия пропилена, %	не выше 15	40–80
Селективность по эпоксипропану, %	25	100
Стереоспецифичность	рацемическая смесь	80–90% R-1,2-эпоксипропана
Токсичные побочные продукты	альдегиды, монооксид углерода, ароматические соединения	отсутствуют

Таблица 2. Сравнительная характеристика процессов прямого парциального окисления метана в метанол.

Параметры	Химический процесс		Биокаталитический процесс ^{17,18}
	гомогенный ^a	гетерогенный ^b	
Температура, °C	450–550	250–350	20–40
Давление, атм	25–65	1	1
Конверсия метана за проход, %	9–13	4–6	27–61
Селективность по метанолу, %	38–83	83–96	~ 100
Выход по метанолу, %	2–7	3–6	10–60
Продуктивность по метанолу, ммоль · г ⁻¹ · ч ⁻¹		0.001–1.7	1–7

^a По данным^{5,6,15}; ^b по данным^{5,6,16}.

Таким образом, биокаталитические процессы обладают высокой селективностью, обеспечивают возможность получения стереоизомеров химических соединений, требуют небольших энергзатрат и характеризуются относительной экологической чистотой. Поэтому они являются конкурентоспособными по отношению к химическим процессам основного органического синтеза.

III. Микроорганизмы — биокатализаторы прямого парциального окисления газообразных углеводородов

Очевидно, что первой стадией разработки любого биотехнологического процесса является поиск (скрининг) микроорганизмов, обладающих необходимой ферментативной активностью. Парциальное окисление насыщенных и ненасыщенных газообразных углеводородов $C_1 - C_4$ осуществляют преимущественно газоассимилирующие микроорганизмы. Имеются лишь отдельные примеры, когда бактериальные клетки, выращенные на жидких углеводородах C_5 и выше, окисляли газообразные субстраты. Например, суспензии бактериальных клеток микроорганизма *Nocardia*, выращенного на изопрене, способны эффективно окислять пропилен и бутилен в соответствующие эпоксиды.²² Другие микроорганизмы, использующие для своего роста углеводороды $C_5 - C_{18}$, не окисляют газообразные алканы и алкены.

Первая газоассимилирующая бактерия, использующая для своего роста в качестве единственного источника угле-

рода метан, была выделена в чистом виде в 1906 г., и до 1954 г. было описано всего пять видов таких бактерий, называемых метанотрофами.^{23, 24} В настоящее время появилась глубокая убежденность, что микроорганизмы, способные ассимилировать такие инертные с химической точки зрения соединения, как насыщенные газообразные углеводороды, широко распространены в природе. Выделено около 200 штаммов метанотрофов^{25, 26} из мест их обитания: пресных и соленых водоемов, подземных и сточных вод, болот, почв, угольных шахт и даже из рубца жвачных животных.²³ Почвенные микроорганизмы рода *Rhodococcus* (родококки) утилизируют в качестве источника углерода пропан и бутан.²⁷

Газоассимилирующие микроорганизмы можно разделить на следующие группы:

1) метанотрофы (основные представители из родов *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylomonas*) — высокоспециализированные микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода и энергии метан; глюкоза и другие органические соединения полностью ингибируют их рост;

2) алканассимилирующие микроорганизмы (основные представители из родов *Rhodococcus*, *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Xantobacter*), которые утилизируют этан, пропан, бутан и практически не способны расти на метане; глюкоза и некоторые органические кислоты поддерживают их рост;

3) алкенассимилирующие микроорганизмы (основные представители из родов *Mycobacterium*, *Xantobacter*, *Nocardia*), растущие на газообразных алкенах (этилене, пропилене, бутиле, бутадиене); они способны также утилизировать глюкозу.

Характерными отличиями двух последних групп микроорганизмов, выращенных на газообразных углеводородах (особенно на алканах), от таких же микроорганизмов, выращенных на глюкозе или органических кислотах, являются относительно высокое содержание липидов в клетке и строение клеточной стенки, которая представляет собой мощное липофильное образование.²⁸ Типичным примером могут служить клетки *Mycobacterium vaccae*: такие клетки, выращенные на этане (пропане, *n*-бутане), содержат в 2 раза больше липидов, чем клетки, выращенные на ацетате (пропионате).²⁹ Эти клетки обладают и другой интересной особенностью: при замене ацетата в качестве ростового субстрата на пропан синтез клеточных липидов предшествует синтезу азотсодержащих соединений (белков) и делению клеток, что указывает на важную роль липоидных материалов в ассимиляции клетками гидрофобных углеводородных субстратов, необходимых для их роста.²⁹ В настоящее время доказано, что на начальном этапе ассимиляции углеводорода микроорганизмами происходит пассивная диффузия молекул к клетке и их сорбция на клеточной стенке.^{27, 30} На следующем этапе протекает метаболический процесс, включающий активный (с затратами энергии) транспорт углеводорода в клетку, где внутриклеточно на мембранных структурах (микросомах) происходит его окисление.^{27, 28} У родококков, выращенных на пропане, наблюдается избыточное развитие наружной мембраны клеточной стенки и отчетливо выявляется хорошо развитая сеть внутриклеточных мембранных структур на периферии клеток.²⁷

Все процессы окислительной микробиологической трансформации углеводородов протекают с участием молекулярного кислорода и осуществляются ферментативными оксигеназными комплексами (монооксигеназами), строение которых и функциональная роль в клеточном метаболизме широко освещены в литературе.^{23, 31–33} В данном обзоре мы лишь кратко останавливаемся на строении активного центра ключевого фермента, осуществляющего первичную активацию газообразного углеводорода и последующее внедрение в его состав одного из атомов молекулы кислорода с образованием спирта или эпоксида. Такая ферментативная активность микроорганизмов второй и третьей групп

индуцируется углеводородом в процессе роста клеток^{27, 30} (при этом клетки растут относительно медленно, период удвоения составляет десятки часов). Клетки, выращенные на глюкозе или органических кислотах, как правило, такой активностью не обладают и не способны трансформировать углеводороды. Исключение составляет японский штамм *Nocardia corallina* B-276, покоящиеся клетки которого, выращенные на глюкозе, способны эпоксидировать алкены,^{34, 35} однако выход эпоксида при этом почти в 2 раза меньше, чем в среде с клетками, выращенными на пропилене.³⁴

В зависимости от того, применяется ли в качестве ростового субстрата алкан или алкен, в клетке индуцируются и синтезируются различные по свойствам ферментативные комплексы, а именно алканмонооксигеназа или алкенмонооксигеназа, ответственные за первичную активацию газообразного углеводорода.^{22, 36} Алканмонооксигеназа обладает более широкой субстратной специфичностью, чем алкенмонооксигеназа: она гидроксилирует алканы и эпоксидирует алкены, в то время как алкенмонооксигеназа способна только эпоксидировать алкены (но не способна гидроксилировать алканы). Микроорганизмы, выращенные на алканах, как правило, не способны расти на алканах. Интересно, что эти две ферментные системы (или клетки микроорганизмов с индуцированной ферментативной активностью) отличаются друг от друга также по своей стереоспецифичности: метан- и алканмонооксигеназы в процессе эпоксидирования алкенов C₃–C₄ образуют, как правило, рацемическую смесь оптических изомеров эпоксидов, тогда как при использовании алкенмонооксигеназы наблюдается избыток (80–90%) энантиомерных форм. В обоих случаях конфигурация алкена (бутилена) сохраняется (табл. 3–7).^{22, 41} Исключительными характеристиками обладает японский штамм *Nocardia coralina* B-276: независимо от применяемого ростового субстрата (глюкоза, алканы, алкены) в клетках этого микроорганизма образуется в избытке один из оптических изомеров эпоксида.^{2, 3}

В настоящее время описаны и охарактеризованы два основных типа ферментативных монооксигеназных систем микроорганизмов, способных ассимилировать углеводороды, в том числе газообразные:

1) в клетках метанотрофов имеются монооксигеназы, содержащие в активном центре оксо- или гидроксомостиковый кластер железа^{32, 33, 62} (рис. 1, а);

2) в клетках *Nocardia*,⁶³ *Rhodococcus*,⁶³ *Mycobacterium*,⁶³ *Xantobacter*,⁶⁴ *Corynebacterium*⁶⁵ находятся гемсодержащие монооксигеназы типа цитохрома P-450 (рис. 1, б).

Следует отметить, что термин «монооксигеназа» применяют не к индивидуальному ферменту, а к целой ферментной системе, которая состоит по крайней мере из двух-трех компонентов, выполняющих различные функции (транспортную для электронов, регулярную и окислительную).³² На рис. 1 показано строение активных центров фермента, выполняющего именно окислительную функцию, которая состоит в том, что один атом кислорода внедряется в молекулу углеводорода с образованием спирта или эпоксида, а другой входит в молекулу воды (рис. 2).

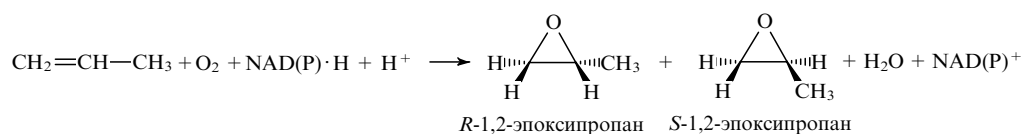
Механизм микробиологического окисления углеводородов в спирты, в частности метана в метанол, достаточно хорошо изучен. Имеются данные о том, что лимитирующей стадией этого процесса является разрыв С-Н-связи.^{25, 32, 33} Метанмонооксигеназа различных штаммов метанотрофов обладает широкой субстратной специфичностью: она гидроксилирует алканы C₁–C₈ с образованием первичных и вторичных спиртов,^{32, 66} эпоксидирует алкены C₂–C₄,^{32, 54} окисляет ряд ароматических (бензол, толуол, стирол) и алициклических (циклогексан) углеводородов.^{25, 32, 67} Способность метанотрофов с помощью метанмонооксигеназы окислять хлорпроизводные алкенов (дихлорэтилен, трихлорэтилен, винилхлорид) открывает перспективы их применения для очистки сточных вод: на первой стадии метанотрофы

Таблица 3. Парциальное окисление этилена в этиленоксид газоассимилирующими микроорганизмами.

Ростовой субстрат	Микроорганизм (способ иммобилизации)	α^a	Ссылки	Ростовой субстрат	Микроорганизм (способ иммобилизации)	α^a	Ссылки
Метан	Метанотроф Н-2	93	37	Этилен	<i>Mycobacterium</i> 2W	4	12
	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	33 [46]	12, 31, 38–40		<i>Mycobacterium</i> E44, 12D, Tu1	3	12
	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	16 [16]	12, 31, 39–41		<i>Mycobacterium</i> 32	1	12
	<i>Methylobacterium organophilum</i>	[7.5]	31, 40	Пропилен	<i>Mycobacterium</i> Py1	50	12, 45–47
Этан	<i>Brevibacterium fuscum</i> ATCC 15993	17.5	42		<i>Xantobacter</i> Py2	46	39, 46–48
	<i>Mycobacterium</i> CRL-69	14	42	Бутилен-1 (2)	<i>Mycobacterium</i> Py8	25	12
	<i>Arthrobacter</i> CRL-68	8	42		<i>Mycobacterium</i> Py1 (включение в альгинат)	6	45
					<i>Mycobacterium</i> Py1 (адсорбция на песке)	5	45
Пропан	<i>Alcaligenes</i> ATCC 15525	43	43		<i>Mycobacterium</i> By1	19	12
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-1244	28	43	Бутадиен-1,3	<i>Xantobacter</i> By2	11	46
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PNKb1	22	44		<i>Nocardia</i> By1	9	46
	<i>Brevibacterium</i> CRL-56	16	39, 43		<i>Nocardia</i> TB1	2	46
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3/89	[7]					
n-Бутан	<i>Arthrobacter</i> CRL-70	38	42	CO ₂ /NH ₄	<i>Nocardia</i> BT1	17	46
	<i>Arthrobacter</i> CRL-60	32	42		<i>Mycobacterium</i> B	11	12
	<i>Pseudomonas</i> CRL-71	20	42				
	<i>Mycobacterium</i> E20	15	12		<i>Nitrosomonas europaea</i>		39

^a Активность клеточной суспензии в нмоль · мин⁻¹ · (мг белка)⁻¹ [нмоль · мин⁻¹ · (мг сухих клеток)⁻¹], которая определяется как скорость внеклеточной аккумуляции эпоксида этилена в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

Таблица 4. Парциальное окисление пропилена в 1,2-эпоксипропан газоассимилирующими микроорганизмами.



Ростовой субстрат	Микроорганизмы	α^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			R-изомер	S-изомер	
Метан	<i>Methylomonas</i> Z 201	[60]			49
	<i>Methylococcus capsulatus</i>	215 [46]	56	44	31, 39, 40, 41, 50–53
	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	175 [30]	57	43	22, 31, 39, 40, 41, 52–54
	Метанотроф Н-2	100			37
	<i>Methylosinus</i> CRL	37			40, 55
	<i>Methylobacterium organophilum</i>	22 [21]			31, 40
	<i>Methylomonas albus</i> BG8		53	47	22, 40
Этан	<i>Methanomonas</i> GY-J-3	21 [0.1]			52, 56
	<i>Mycobacterium</i> E20		47	53	14
	<i>Arthrobacter</i> CRL-60	33			42
	<i>Mycobacterium rhodochrous</i>	27			42
	<i>Brevibacterium fuscum</i>	20			42
Пропан	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-1244	102			43
	<i>Nocardia paraffinica</i>	72			43
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PNKb1	50			44
	<i>Brevibacterium</i> CRL-61	47			43
	<i>Corynebacterium</i> CRL-63	40			43
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3/89	[9]			57, 58

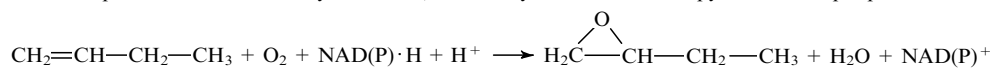
Таблица 4 (окончание).

Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			R-изомер	S-изомер	
Пропан	<i>Rhodococcus</i> 1r	[1]			50
	<i>Scedosporium</i> A-4	[1]			59
	<i>Nocardia carollina</i> B-276	[0.5]	87	13	22, 34, 39
	<i>Mycobacterium</i> P2y		78	22	22
	<i>Pseudomonas</i> P9y		45	50	22, 39
n-Бутан	<i>Arthrobacter</i> CRL-70	58			42
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-1244	52			42
	<i>Corynebacterium</i> CRL63	40			42
	<i>Mycobacterium</i> E20	17			12
	<i>Mycobacterium vaccae</i>		56	44	22
	<i>Nocardia</i> TB1		68	32	22, 39
	<i>Nocardia</i> IP1		91	9	22, 39
Этилен	<i>Mycobacterium</i> E3	46 [2.5]	93	7	12, 14, 22, 39
	<i>Mycobacterium</i> 2W, Eul	11	93	7	46, 50, 60
	<i>Nocardia carollina</i> B-276	[0.5]	86	14	12, 14, 22, 46, 60
	<i>Mycobacterium</i> E20		88	12	22, 34, 39
	<i>Mycobacterium aurum</i> L1		99	1	14
Пропилен	<i>Mycobacterium</i> Py1	9.5 ^b			22, 39
	<i>Nocardia corallina</i> B-276	[3.5]			61
	<i>Mycobacterium</i> Py2		97 ^b	3 ^b	14
транс-Бутен-2	<i>Mycobacterium vaccae</i>		61	39	22
	<i>Nocardia</i> TB1	2	60	40	22, 39, 46
Бутадиен-1,3	<i>Mycobacterium</i> B	21	93	7	12, 14
	<i>Nocardia</i> TB1	13	93	7	22, 46
	<i>Nocardia</i> IP1		90	10	22, 39
CO ₂ /NH ₄	<i>Nitrosomonas europaeae</i>	—	32	68	22, 39

^a Активность покоящихся клеток в нмоль·мин⁻¹·(мг белка)⁻¹ [моль·мин⁻¹·(мг сухих клеток)⁻¹], которая определяется как скорость внеклеточной аккумуляции 1,2-эпоксипропана в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

^b В присутствии 10 мМ 1,2-эпоксипропана как ингибитора дальнейшего окисления образовавшегося 1,2-эпоксипропана.

Таблица 5. Парциальное окисление бутилена в 1,2-эпоксипропан газоемкими микроорганизмами.



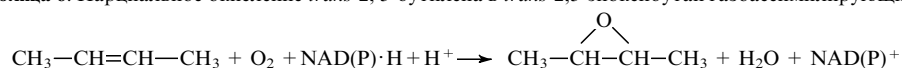
Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			R-изомер	S-изомер	
Метан	<i>Methylococcus capsulatus</i>	[11]			31, 40
	<i>Methylobacterium organophilum</i>	[8]			31, 40
	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	[4]	39	64	22, 31, 39, 40, 54
	Метанотроф H-2	64.5			37
Этан	<i>Mycobacterium</i> E20, CRL-69	4	41	59	14, 42
	<i>Brevibacterium fuscum</i>	3			42
	<i>Arthrobacter</i> CRL-68	2			42

Таблица 5 (окончание).

Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			<i>R</i> -изомер	<i>S</i> -изомер	
Пропан	<i>Nocardia paraffinica</i> NNRL11326	67			43
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PNKb1	26			44
	<i>Pseudomonas cruceatae</i>	15			43
	<i>Pseudomonas</i> P9y		45	50	22, 39
	<i>Mycobacterium</i> P2y		77	23	22
	<i>Nocardia corallina</i> B-276		84	16	22, 39
<i>n</i> -Бутан	<i>Pseudomonas</i> CRL-71	32			42
	<i>Mycobacterium rhodochrous</i>	3			42
	<i>Arthrobacter</i> CRL-60	2			42
	<i>Mycobacterium vaccae</i>		58	42	22
	<i>Nocardia</i> TB1		69	31	22, 39
	<i>Nocardia</i> IP1		87	13	22, 39
Этилен	<i>Mycobacterium</i> E3, E4, Eu, 2D	15	84	16	12, 14, 22, 39, 46
	<i>Mycobacterium</i> E44, 2W	11	83	17	12, 14, 22, 46
	<i>Mycobacterium</i> E20		81	19	14
	<i>Mycobacterium aurum</i> L1		90	10	22, 39
	<i>Nocardia corallina</i> B-276		84	16	22, 39
Пропилен	<i>Mycobacterium</i> Py10, Py2		95 ^b	5 ^b	14
Бутен-2	<i>Mycobacterium vaccae</i>		64	36	22
	<i>Nocardia</i> TB1	2	63	37	22, 39, 46
Бутадиен-1,3	<i>Mycobacterium</i> B	17	89	11	12, 14
	<i>Nocardia</i> TB1	16	89	11	22, 46
	<i>Nocardia</i> IP1		95	5	22, 39
CO ₂ /NH ₄	<i>Nitrosomonas europaea</i>		29	71	22, 39

^a Активность покоящихся клеток в нмоль·мин⁻¹·(мг белка)⁻¹ [моль·мин⁻¹·(мг сухих клеток)⁻¹], которая определяется как скорость внеклеточной аккумуляции 1,2-эпоксипропана в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

^b В присутствии 10 мМ 1,2-эписпропана как ингибитора дальнейшего окисления образовавшегося 1,2-эпоксипропана.

Таблица 6. Парциальное окисление *trans*-2, 3-бутилена в *trans*-2,3-эпоксипропан газоассимилирующими микроорганизмами.

Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			<i>R</i> -изомер	<i>S</i> -изомер	
Метан	<i>Methylococcus capsulatus</i>		51	49	22, 39
	<i>Methylomonas albus</i> BG8		50	50	22
	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b		50	50	22, 39
	<i>Methylocystis parvus</i> OBVP		52	48	22
	Метанотроф H-2	17.5			37
Пропан	<i>Nocardia corallina</i> B-276		73	27	22, 39
<i>n</i> -Бутан	<i>Nocardia</i> IP1		81	19	22, 39
Этилен	<i>Mycobacterium</i> E3	20	85	15	12, 14, 22, 39, 46
	<i>Mycobacterium</i> 2W	13	78	22	12, 14, 22, 46
	<i>Mycobacterium</i> NCIB 11626		79	21	22
	<i>Mycobacterium aurum</i> L1		87	13	22, 39

Таблица 6 (окончание).

Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Энантиомерный состав продукта, %		Ссылки
			R-изомер	S-изомер	
Пропилен	<i>Mycobacterium</i> Py8	41	93	7	22
	<i>Xantobacter</i> Py2		89	11	22, 39, 46
Бутен-1	<i>Xantobacter</i> By2	22	82	18	22, 46
	<i>Nocardia</i> By1	11	78	22	22, 39, 46
Бутадиен-1,3	<i>Nocardia</i> BT1	19	80	20	22, 46
	<i>Nocardia</i> IP1		81	19	22, 39

^a Активность покоящихся клеток в $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot (\text{мг белка})^{-1}$, которая определяется как скорость внеклеточной аккумуляции *trans*-2,3-эпоксидбутана в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

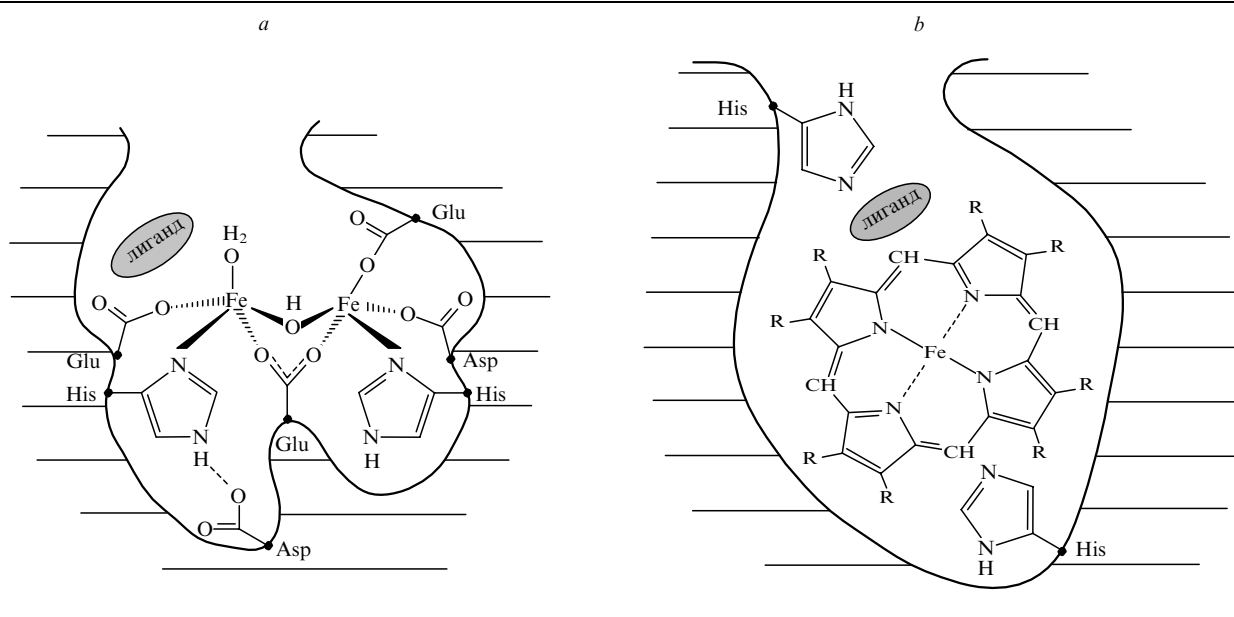


Рис. 1. Активные центры окисления углеводородных субстратов монооксигеназ метанотрофов ³³ (a) и некоторых других газоассимилирующих микроорганизмов (b).

Обозначения: Asp — аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты в белковой части монооксигеназы; Glu — аминокислотный остаток глутаминовой кислоты; His — аминокислотный остаток гистидина; R — углеводородный остаток в молекуле гема; лиганд — низкомолекулярные соединения, в том числе субстраты (углеводороды, кислород и ингибиторы).

окисляют хлорированный алкен до эпоксида, который в дальнейшем при участии сообщества микроорганизмов деградирует, образуя нетоксичные продукты — углекислый газ и ионы хлора.^{68–70}

В процессе биоокисления углеводородов монооксигеназой расходуется так называемый кофактор (или кофермент), выполняющий функцию донора электронов (рис. 2). Природными кофакторами для монооксигеназы являются восстановленные формы высокомолекулярных производных никотинамида (никотинамидаденидинуклеотиды, сокращенно NAD·H или NADP·H).

Если для окислительных биотрансформаций используются целые жизнеспособные клетки (а не бесклеточные экстракты ферментов), природные кофакторы могут регенерироваться внутриклеточно в результате протекания сопряженных ферментативных реакций с участием низкомолекулярных субстратов. Например, для метанмонооксигеназы эффективными донорами электронов являются промежуточные продукты метаболизма метана — метанол,⁷¹ формальдегид^{41, 55} и формиат,^{41, 55} которые под действием внутриклеточных ферментов окисляются с обра-

зованием восстановленной формы NAD(P)·H. Последняя, в свою очередь, расходуется метанмонооксигеназой на окисление молекулы углеводорода^{25, 33} (рис. 2).

Было обнаружено, что в некоторых случаях добавление в реакционную среду этанола и этилацетата продлевает процесс биоэпоксидирования пропилена микобактериями. Кроме того в их присутствии увеличивается скорость образования эпоксипропана.⁶⁰ По-видимому, эти соединения участвуют в регенерации природного кофактора монооксигеназы данных бактерий.

Для родококков пока не удалось обнаружить низкомолекулярного донора электронов.⁵⁰ Глюкоза, добавленная в клеточную суспензию японского штамма *Nocardia corallina* B-276, способствует регенерации кофактора монооксигеназы.^{35, 72 73} Очевидно, решение проблемы замены дорогостоящих и практически недоступных природных кофакторов низкомолекулярными субстратами может сделать окислительный биокатализ на основе целых жизнеспособных клеток перспективным с точки зрения его практического применения.

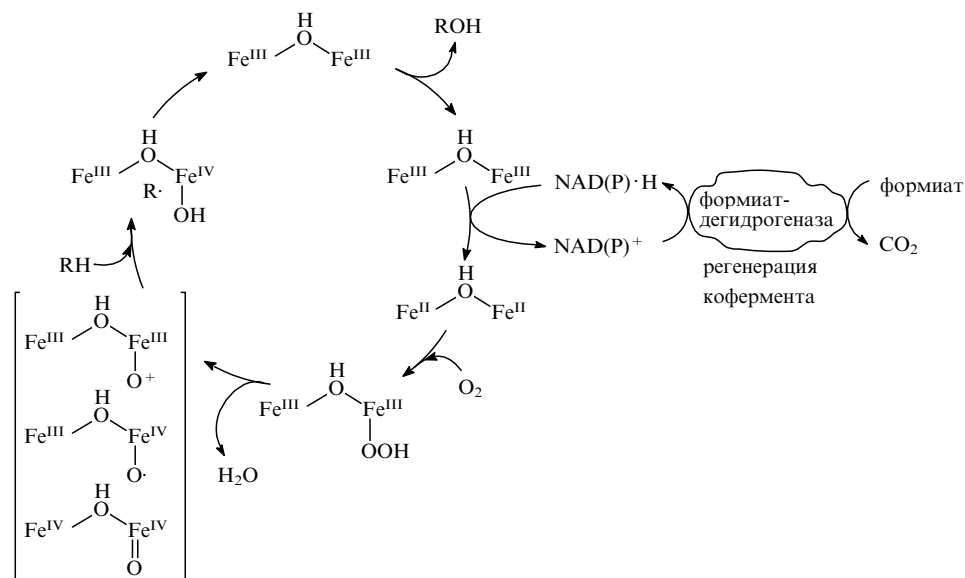
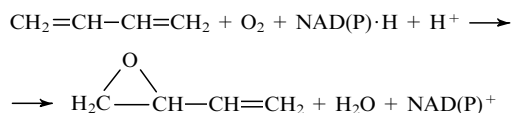


Рис. 2. Механизм гидроксирования алканов RH монооксигеназой метанотрофов³³ и возможный путь регенерации кофермента NAD(P)·H в результате сопряженной ферментативной реакции.

Таблица 7. Парциальное окисление бутадиена-1,3 в 1,2-эпоксипутен газоассимилирующими микроорганизмами.



Ростовой субстрат	Микроорганизмы	a^a	Ссылки
Метан	<i>Methylococcus capsulatus</i>	[37]	31
	<i>Methylobacterium organophilum</i>	[23]	31
	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ^b	[21]	31, 40, 54
	Метанотроф Н-2	85.5	37
Этан	<i>Brevibacterium fuscum</i> ATCC 159993	1	42
	<i>Arthrobacter</i> CRL-68	1	42
	<i>Mycobacterium</i> CRL-69	1	42
Пропан	<i>Nocardia paraffinica</i> ATCC 21198	53	43
	<i>Nocardia</i> NRRL 11326	16	43
	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17453	13	43
	<i>Brevibacterium fuscum</i> ATCC 159993	6	43
n-Бутан	<i>Brevibacterium fuscum</i> ATCC 159993	3	42
	<i>Mycobacterium rhodochrous</i>	1	42
	<i>Pseudomonas</i> CRL-71	0.5	42
	<i>Arthrobacter</i> CRL-70	0.5	42

^a Активность покоящихся клеток в нмоль·мин⁻¹·(мг белка)⁻¹ [нмоль·мин⁻¹·(мг сухих клеток)⁻¹], которая определяется как скорость внеклеточной аккумуляции 1,2-эпоксипутена в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

^b Отношение (в %) R-изомер : S-изомер составляет 36 : 64.

Таким образом, прямое селективное окисление газообразных углеводородов можно осуществить биокаталитическими методами при участии газоассимилирующих микроорганизмов, обладающих монооксигеназной активностью, причем эти процессы характеризуются высокой селективностью и стереоспецифичностью и протекают в

мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов (единственным возможным продуктом такого рода является углекислый газ).

IV. Микробиологическое эпоксирирование низших олефинов

Микробиологическое эпоксирирование низших олефинов было впервые осуществлено в 1963 г., когда с помощью клеток *Pseudomonas aeruginosa*, выращенных на гептане, удалось получить 1 мг 1,2-эпоксипутана из октена-1.⁷⁴ В последнее десятилетие исследования в этой области проводились научными коллективами многих стран (табл. 8). Как уже отмечалось, некоторые «биотехнологические» способы

Таблица 8. Микробиологическое эпоксирирование олефинов.

Эпоксирируемые олефины	Микроорганизмы	Исследовательские группы
C ₂ –C ₄	Метанотрофы: <i>Methylococcus capsulatus</i> , <i>Methylosinus trichosporium</i>	C.T. Hou (EXXON Res. & Eng. Co., USA); H.Dalton, J.C.Murrell (University of Warwick, UK)
C ₂ –C ₄	<i>Mycobacterium</i> sp.	J.A.M. de Bont (Agriculture University of Wageningen, Netherland)
C ₂ –C ₁₈	<i>Nocardia corallina</i> B-276	K.Furuhashi (Nippon Mining Co. Ltd, Japan)
C ₂ –C ₃	<i>Caldariomyces fumago</i> , <i>Flavobacterium Cetus</i> sp.	S.L.Neidleman (CETUS Corp., USA) ^{75–77}
C ₆ –C ₁₂	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M.J.de Smet (University of Groningen, Netherland)

получения эпоксидов из олефинов реализованы в полупромышленном масштабе.^{2,3} Эпоксидирование газообразных алкенов осуществляют микроорганизмы, выращенные как на газообразных алканах (метане, этане, пропане), так и на газообразных алкенах (этилене, пропилене, бутилене) (см. табл. 3–7), причем монооксигеназа алканассимилирующих микроорганизмов обладает способностью не только эпексидировать алкены, но и гидроксिलировать терминальную CH_3 -группу с образованием ненасыщенных спиртов.⁷⁸

Интересно отметить, что в реакциях окислительной биотрансформации алкенов, осуществляемых *Pseudomonas oleovorans*,⁷⁸ отсутствует какая-либо взаимосвязь между химической реакционной способностью окисляемых связей и окислительной активностью микроорганизмов. Например, октен-2 не эпексидируется, тогда как октен-1 подвергается окислению с образованием 1,2-эпоксиоктана; пропилен также не эпексидируется, а трансформируется в аллиловый спирт.

Эпоксиды, образовавшиеся в процессе окислительной биотрансформации, если они не являются промежуточными продуктами метаболизма основного ростового субстрата, а образуются благодаря относительно широкой субстратной специфичности монооксигеназы, накапливаются внеклеточно в реакционной среде. Например, этиленассимилирующие микобактерии, эффективно окисляющие пропилен и бутилен, осуществляют внеклеточное аккумуляирование их эпексидов (табл. 4–6), в то время как этиленоксид подвергается дальнейшим метаболическим превращениям, необходимым для роста клетки и биосинтеза. Чтобы воспрепятствовать метаболическим превращениям эпексидов, образовавшегося при окислении ростового субстрата, можно добавить в среду ингибитор. Например, ингибитором дальнейшего окисления 1,2-эпоксипропана, образуемого пропиленассимилирующими клетками, является родственный ему 1,2-эпоксибутан, который подвергается деградации, оставляя эпоксипропану возможность накапливаться в среде.^{45,79}

Аккумуляированные в среде эпексиды обладают ярко выраженным токсическим действием, так как они способны алкилировать белковые молекулы и разрушать мембраны (это позволяет использовать их в качестве стерилизующих агентов в медицинской практике, причем наиболее токсичен этиленоксид). Ингибирование эпексидов является необратимым и специфичным по отношению к монооксигеназам, другие жизненно важные ферменты инактивируются незначительно.⁷⁹ Различные микроорганизмы неодинаково восприимчивы к действию эпексидов: наиболее устойчивы алкенилизирующие микроорганизмы рода *Mycobacterium* (они выдерживают концентрацию до 100 мМ), самыми чувствительными являются метанотрофы (выраженное токсическое действие на них оказывает эпексид в концентрации менее 10 мМ).⁷⁹

Для практического решения проблем уменьшения токсического действия эпексидов, концентрирования и выделения ценного оксипродукта из реакционной среды предложены следующие подходы:

- иммобилизация клеток на/в твердых носителях, в результате которой, как правило, повышается устойчивость микроорганизмов к воздействию токсических реагентов;

- удаление образовавшегося эпексидов из зоны реакции, осуществляемое либо путем его экстракции в фазу растворителя двухфазной системы вода – несмешивающийся органический растворитель, либо посредством продувания газовым потоком с последующим выделением целевого продукта абсорбцией в подходящей органической фазе.

Эти подходы можно наглядно проиллюстрировать на примере эпексидирования пропилена (табл. 9). Газоутилизирующие микроорганизмы иммобилизуют в основном путем включения их в природные органические гели (альгинат, каррагенан), в матрице которых клетки практически полностью сохраняют свою интактность (целостность,

метаболическую активность) и достаточно высокую трансформирующую активность и стабильность.^{12, 13, 60, 80, 83–88, 90} Основным недостатком органических гелей является их набухаемость, вызывающая большое гидродинамическое сопротивление потоку, а также их разрушение в процессе эксплуатации под действием химических и биологических факторов.

Другим методом иммобилизации бактериальных клеток является адсорбция (адгезия) на поверхности неорганических носителей (силикатов, оксидов, углеродных материалов).^{31, 50, 55, 56, 60, 71, 81, 89} При этом, как правило, происходит образование биопленок. Ковалентная иммобилизация используется редко, так как сшивающие агенты, применяемые для образования ковалентных связей (диальдегиды, карбодиимиды), чаще всего токсичны для клеток.

Интересные перспективы открывает иммобилизация микроорганизмов в мезофазах неионных поверхностно-активных веществ (типа полиоксиэтилен-*n*-додецилэфиров с различным молекулярным весом), образующихся в двухфазной системе вода – органический растворитель (гексадекан).⁸² Иммобилизованные таким способом клетки *Mycobacterium* E3 обладают максимальной эпексидирующей активностью⁸² (табл. 9).

Другой нетривиальный подход к иммобилизации ферментов и бактериальных клеток заключается в «замуровывании» биологически активного материала с помощью гелеобразующей системы в порах неорганического носителя.⁹¹ По существу, это метод двойной иммобилизации, который сочетает в себе преимущества включения клеток в гели (высокая биокаталитическая активность и стабильность) и использования неорганических носителей (высокая механическая прочность и устойчивость к деградации). Гетерогенный биокатализатор, полученный таким способом, обладает относительно высокой ферментативной активностью, он стабилен как при хранении, так и в операционных условиях.⁵⁰ (табл. 9).

Одной из основных проблем иммобилизации ферментов и клеток является выбор оптимального носителя и способа иммобилизации. В настоящее время к иммобилизации ферментов и клеток подходят чисто эмпирически, опираясь преимущественно на традиции, сложившиеся в той или иной исследовательской группе. Однако анализ большого объема литературных данных и собственных результатов позволяет нам сформулировать некоторые общие принципы иммобилизации и стабилизации ферментов и микробных клеток на/в твердых матрицах.

Стабилизацию иммобилизованных ферментов и клеток обеспечивает взаимное соответствие характеристик биологически активного материала и носителя. Прежде всего биомолекула (клетка) должна геометрически соответствовать размеру пор носителя (ячеек геля), благодаря чему реализуется многоточечное взаимодействие. Для стабилизации бактериальных клеток и поддержания их жизнеспособности в иммобилизованном состоянии необходимо, чтобы морфология пористого пространства носителя определенным образом соответствовала биологически активному материалу: отношение размера пор к размеру (длине) микроорганизма должно составлять величину от 1:5, причем поры данного размера должны занимать ~70% пористого пространства.⁹² Иными словами, в структуре носителя должны преобладать макропоры размером 1–10 мкм.

Другим принципом является взаимное химическое соответствие биомолекулы (клетки) и поверхности носителя (геля), в частности, с точки зрения их гидрофильно-гидрофобных характеристик.⁹³ Например, микроорганизмы с гидрофобной клеточной стенкой наиболее прочно сорбируются на гидрофобной же поверхности носителя (или в гидрофобной мезофазе) и обладают относительно высокой биокаталитической активностью и стабильностью.⁸² Практическая реализация принципов взаимного соответствия,

Таблица 9. Эпоксидирование пропилена иммобилизованными клетками газоассимилирующих организмов.

Микроорганизм	Способ иммобилизации	Характеристики процесса		Биореактор ^b	Ссылки
		<i>a</i> ^a	другие параметры		
<i>Methanomonas</i> GYJ-3	Адсорбция на песке, цеолите, оксиде алюминия, полипропилене, парафине	0.25 (песок) 0.19 (полипропилен)	Адсорбция: 1.5 (песок), 3.4 мг·г ⁻¹ (полипропилен)	Г – ТТ, проточный с неподвижным слоем	56
	Включение в альгинатный гель	1.2		Ж – ТТ, периодический с перемешиванием	80
<i>Methylosinus</i> CRL 31, <i>Methylococcus</i> CRLM1, <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	Адгезия в виде биопленки на пористом стекле	8 – 15	Стабильность: 18 ч непрерывной работы (регенерация парами метанола каждые 10 ч). Конверсия пропилена: 2.7%	Г – ТТ, проточный с неподвижным слоем	31, 55, 71
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b <i>Methylococcus capsulatus</i> M1	Адгезия на стеклянных шариках, активированном угле, силикагеле		Выход продукта: 250 – 300 ммоль·мин ⁻¹ Стабильность: 7 ч непрерывной работы	Г – ТТ	81
<i>Rhodococcus</i> <i>Mycobacterium</i> E3, <i>Methylosinus trichosporium</i>	Адсорбция на силикагеле, угле, зауглероженном оксиде алюминия; двойная иммобилизация в порах зауглероженного алюмосиликата	10 – 20	Адсорбция, мг·г ⁻¹ : 40 (родококки), 3 (метанотрофы) Стабильность: за 14 ч непрерывной работы сохраняется 46% первоначальной активности	Ж – ТТ, проточный с неподвижным слоем	50
<i>Mycobacterium</i> E3	Лиотропная мезофаза ПАВ в двухфазной системе вода – гексан	26.3			82
	Включение в альгинатный гель	0.07	Стабильность: 1 неделя Производительность: 0.03 г R-эпоксипропана на 1 г клеток за 2 дня	Ж – ТТ, проточный с рециркуляцией и неподвижным слоем в двухфазной системе вода – органический растворитель	83, 85, 86, 89
	Включение в альгинатный гель	2.3		Г – Ж – ТТ, проточный с псевдооживленным слоем	86
<i>Mycobacterium</i> E3, E4, 2W	Включение в альгинат, каррагенан	2.5	Стабильность: 3 ч непрерывной работы	Ж – ТТ, периодический с перемешиванием	12, 87, 88
<i>Mycobacterium</i> Py1	На песке		Продуктивность: 0.25 ммоль за 4 дня	Г – ТТ	89
<i>Mycobacterium</i> Eu1	Адгезия на лаве	2.6 ^c	Стабильность: 20 дней работы (16 циклов по 15 ч каждый). Конверсия пропилена: 90%	Г – ТТ	60
<i>Nocardia corallina</i> B-276	Эмульсия в жидком парафине	7.1	Стабильность: 9 суток непрерывной работы, $t_{1/2} = 200$ ч. Конверсия пропилена: 95 – 100%. Продуктивность: 2.3 г эпоксипропана на 1 г клеток	Ж – Ж, непрерывное барботирование газового потока	72

Таблица 9 (окончание).

Микроорганизм	Способ иммобилизации	Характеристики процесса		Биореактор ^b	Ссылки
		<i>a</i> ^a	другие параметры		
<i>Nocardia corallina</i> B-276	Адсорбция на полипропилене, полиэтилене	5.0–6.8	Адсорбция: 1.0–2.8 мг·г ⁻¹ . Стабильность: 2–3 суток работы, $t_{1/2}$ = 36 ч	Г–ТТ, проточный с неподвижным слоем	13
	Включение в альгинат, каррагенан, уретановую матрицу	0.9	Стабильность: $t_{1/2}$ = 78 ч	Г–ТТ, проточный с неподвижным слоем	13
	Включение в полиакриламидный гель	1.3–3.7	Стабильность: 7 суток без потери активности	Ж–ТТ, проточный	90

^a Активность в нмоль·мин⁻¹·(мг сухих клеток)⁻¹, определяемая как скорость внеклеточной аккумуляции пропиленоксида в реакционной среде.

^b Обозначения: Г – газовая фаза; Ж – жидкая фаза; ТТ – фаза твердого тела.

^c Активность выражена в нмоль·мин⁻¹·(мг белка)⁻¹.

особенно в случае иммобилизации индивидуальных ферментов, как правило, способствует получению активных гетерогенных биокатализаторов, которые в десятки-тысячи раз более стабильны, чем их гомогенные аналоги.

К сожалению, при иммобилизации целых бактериальных клеток эффект стабилизации ферментативной активности благодаря взаимодействию микроорганизмов с поверхностью оптимальных носителей (подобранных с учетом взаимного соответствия) не является настолько же выраженным и впечатляющим, как в случае ферментов. По-видимому, ферментативная активность целых бактериальных клеток в большей степени зависит от внутриклеточного микроокружения ферментов, которое лишь опосредованно определяется состоянием иммобилизованных бактериальных клеток.

Механизмы иницирования и стабилизации ферментативной активности в иммобилизованных микроорганизмах могут быть различными в каждом конкретном случае. Например, повышение активности могут способствовать улучшение газообмена и распределения питательных веществ,^{94,95} структурная перестройка мембран, приводящая к повышению проницаемости и ускорению транспорта субстратов внутрь клетки,^{96,97} изменение физиологии клеток под действием стресса, сопутствующего процедуре иммобилизации⁹⁸ и т.д. Очевидно, основное преимущество иммобилизации микробных клеток заключается в возможности получения биокатализаторов в гетерогенной форме, что позволяет осуществлять биокаталитические процессы в непрерывном режиме, применяя биореакторы различной конструкции и многократно используя биологически активный материал. Достаточно часто матрица стабилизирует ферментативную активность иммобилизованных бактериальных клеток, а также повышает устойчивость микроорганизмов, закрепленных на поверхности носителя, к действию токсических соединений.

Другой подход к решению проблемы преодоления ингибирующего действия эпоксидов на клетки газоутилизирующих микроорганизмов состоит в удалении эпоксида из зоны реакции. Для этого используют двухфазные системы вода – органический растворитель (как правило, *n*-гексадекан) с экстракцией эпоксида в органическую фазу^{61,83,84,86} и/или удаление эпоксида, например, эпоксипропана из газовой фазы, где на его долю при 35°C приходится ~3% всех молекул,⁸⁶ посредством поглощения (абсорбции) в ди-*n*-октилфталате или кислотного гидролиза в растворе серной кислоты (рН 1, 30°C).⁸⁴ Иммобилизация микроорганизмов способствует повышению устойчивости бактериальных клеток к действию органического раствори-

теля, по-видимому, из-за наличия водного микроокружения вблизи поверхности твердого носителя.

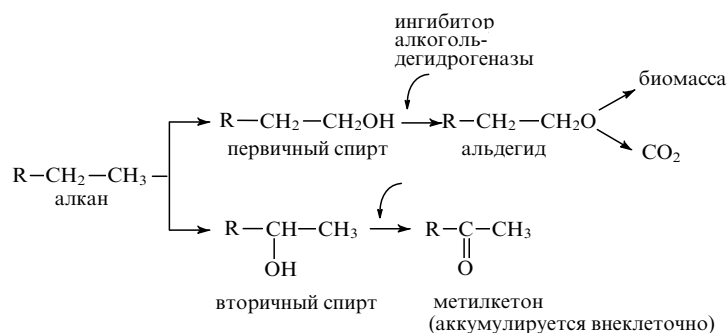
В заключение следует еще раз отметить, что некоторые газоассимилирующие микроорганизмы родов *Mycobacteria* и *Nocardia* способны эпексидировать непредельные углеводороды стереоспецифично, так что в избытке образуется лишь один из оптических изомеров, который аккумулируется внеклеточно в реакционной среде (табл. 4–7). Другой способ получения оптических изомеров эпексидов основывается на том, что определенные микроорганизмы родов *Xantobacter*⁹⁹ и *Nocardia* H8¹⁰⁰ способны подвергать деградации (утилизировать) только один из стереоизомеров рацемической смеси, тогда как другой изомер эпексида накапливается в среде.

Таким образом, эпексидирование легких олефинов (этилена, пропилена, бутилена) может осуществляться ферментативными монооксигеназными комплексами алкан- и алкенилизирующих микроорганизмов находящихся в свободной или в иммобилизованной формах (табл. 4–7, 9). Одним из основных путей повышения эффективности процессов биоэпексидирования олефинов является уменьшение ингибирующего действия эпексидов, которые аккумулируются в реакционной среде и обладают сильно выраженной токсичностью. Для этого осуществляют оптимизацию процессов, используя, например, иммобилизованные микроорганизмы в двухфазных системах вода – органический растворитель.

V. Микробиологическое гидроксидирование газообразных алканов

Как уже отмечалось, прямое селективное окисление предельных углеводородов в ценные оксипродукты (спирты, альдегиды, кетоны, кислоты) является основной проблемой химической переработки природного газа методами гомогенного и гетерогенного катализа. Традиционно парциальное окисление парафинов осуществляют на катализаторах оксидной природы (например, на основе V₂O₅ или MoO₃), при этом ключевым параметром процессов является селективность. Биотехнологический подход к прямому одностадийному окислению алканов кислородом воздуха в спирты и метилкетоны с помощью клеток газоассимилирующих микроорганизмов демонстрирует табл.10.

При микробиологическом гидроксидировании алканов возникают некоторые дополнительные проблемы, которых не существует при эпексидировании олефинов. Одной из них является поиск эффективного ингибитора дальнейшей биоконверсии образовавшегося в реакции спирта (см. схему в

Таблица 10. Парциальное одностадийное окисление газообразных углеводородов в спирты и метилкетоны кислородом воздуха с участием газоассимилирующих микроорганизмов.

Исходный углеводород	Продукт	Микроорганизм (ростовой субстрат)	a^a	Ингибитор (концентрация)	Ссылки
Метан	Метанол	<i>Methylococcus capsulatus</i> (метан)	42	Нет	41
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> (метан) ^b	[149]	Фосфат-ионы (80–100 мМ)	18
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> (метан)	[131]	EDTA (10мМ)	52
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> (метан)	[79]	Фосфат-ионы (80–100 мМ)	18
	»	»	[50]	EDTA (10 мМ)	52
	»	<i>Methylomonas</i> GY-J-3 (метан)	[31]	»	52
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	25 [24]	Обработка клеток циклопропаном; циклопропанол (0.3 мМ)	41, 101, 102
	»	»	[8]	NaCl (0.2 М), EDTA (2 мМ), H ₂ (10%)	17
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	7	Нет	41
	»	<i>Methamonas methanooxidans</i> (метан)	—	Иодацетат (0.003 М)	103
Этан	Этанол	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	22 [12]	EDTA (2 мМ), H ₂ (10%)	17, 41
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> (метан)	33	Нет	41
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	7	»	41
	»	<i>Scedosporium</i> A-4 (пропан)	[6]	Пиразол (10 мМ)	59
Пропан	Пропанол-1	<i>Scedosporium</i> A-4 (пропан)	[5]	»	59
	»	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (пропан)	—	Нет	104
	Пропанол-2	Метанотроф Н-2 (метан)	25	»	37
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> CRL15 (метан)	18	»	105
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> (метан)	18	»	105, 106,
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	12.5	»	41, 105–107
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	8 [3]	EDTA (2 мМ)	17, 105, 106
	»	<i>Scedosporium</i> A-4 (пропан)	[2]	Пиразол (10 мМ)	59
	»	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (пропан)	—	—	104
	»	»	—	—	—

Таблица 10 (окончание).

Исходный углеводород	Продукт	Микроорганизм (ростовой субстрат)	a^a	Ингибитор (концентрация)	Ссылки
Пропан	Ацетон	Метанотроф Н-2 (метан)	50	Нет	37
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> CRL M1 (метан)	42	»	41, 105, 108
	»	<i>Nocardia paraffinica</i> (пропан)	33	»	43
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	30	»	41, 105, 108
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	25 [3]	»	17, 41, 105, 108
	»	<i>Methylobacter</i> CRL M6 (метан)	17	»	105, 108
	»	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (пропан)	17	»	43
	»	<i>Methylocystis parvus</i> (метан)	15	»	105, 108
	»	<i>Scydosporium</i> A-4 (пропан)	[0.6]	»	109
н-Бутан	»	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (пропан)	—	—	110
	н-Бутанол	<i>Scydosporium</i> A-4 (пропан)	[8]	Пиразол (10 мМ)	59
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	5	Нет	41
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> CRL M1 (метан)	2	»	41
	Бутанол-2	Метанотроф Н-2 (метан)	33	»	37
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> CRL M1 (метан)	20	»	41, 106
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	10	»	41, 105, 106
	»	<i>Methylomonas</i> CRL (метан)	10	»	105–107
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	3	»	41
	»	<i>Scydosporium</i> A-4 (пропан)	[2]	Пиразол (10 мМ)	59
	Бутанон-2	<i>Nocardia paraffinica</i> (пропан)	73	Нет	43
	»	<i>Brevibacterium</i> CRL 56 (пропан)	43	»	43
	»	<i>Methylococcus capsulatus</i> CRL M1 (метан)	33	»	41, 105, 108
	»	<i>Methylobacterium organophilum</i> (метан)	25	»	41, 105, 108
	»	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (пропан)	20	»	41, 105, 108
	»	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	20	»	41, 105, 108
	»	<i>Methylomonas</i> CRL 8 (метан)	12	»	105
	»	<i>Scydosporium</i> A-4 (н-бутан)	[0.3]	»	109
	»	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (пропан)	—	—	110
изо-Бутан	изо-Бутанол	Метанотроф Н-2 (метан)	89	Нет	37
	трет-Бутанол	Метанотроф Н-2 (метан)	89	»	37
Циклопропан	Циклопропанол	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (метан)	—	»	102
Пропилен	Аллиловый спирт	<i>Pseudomonas oleovorans</i> (н-октан)	—	»	78
	Акриловая кислота	<i>Mycobacterium convolutum</i> (пропан)	—	»	111
Бутен-1	Бутен-3-ол-1	<i>Pseudomonas oleovorans</i> (н-октан)	—	»	78

^a Активность в $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot (\text{мг белка})^{-1}$ [$\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot (\text{мг сухих клеток})^{-1}$], определяемая как скорость внеклеточной аккумуляции продукта окисления в реакционной среде. Приведены максимальные из описанных в литературе скорости реакции.

^b Имобилизован ковалентным связыванием с DEAE-целлюлозой.

табл. 10). Дело в том, что при росте микроорганизмов на насыщенных углеводородах в результате первичной активации СН-связи углеводорода бактериальной монооксигеназой образуются молекулы первичного или вторичного спиртов (см. рис. 2), которые под действием фермента алкогольдегидрогеназы превращаются соответственно в альдегид или метилкетон.^{23,25,27} При этом молекулы альдегида подвергаются дальнейшим метаболическим превращениям, ведущим к включению углерода в биомассу, в то время как метилкетоны накапливаются в реакционной среде. Проблема поиска эффективного универсального ингибитора для алкогольдегидрогеназы, прерывающего клеточный метаболизм на стадии образования первичного или вторичного спирта, до сих пор не решена, и, по-видимому, ее следует решать индивидуально в каждом конкретном случае. Наиболее эффективными из изученных ингибиторов бактериальных алкогольдегидрогеназ являются циклопропанол, пиразол и натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (табл. 10).

Как и в случае микробиологического эпоксицирования алканов, концентрация конечного оксипродукта (спирта, метилкетона) в реакционной среде не превышает нескольких десятков миллимолей на литр. С течением времени процесс гидроксирования замедляется. Причинами этого замедления могут быть:

- увеличение скорости биоконверсии образующегося спирта;
- расходование кофактора (донора электронов), необходимого для окислительной биотрансформации углеводородов;
- токсическое действие спирта или метилкетона, аккумулярованных в реакционной среде, на микробную клетку.

Таким образом, при проведении процесса гидроксирования возникают проблемы ослабления токсического действия образующегося оксипродукта, регенерации кофактора монооксигеназы с помощью доступных низкомолекулярных субстратов сопряженных ферментативных реакций и выделения конечного оксипродукта из разбавленных буферных растворов. Дополнительно приходится решать и проблему ингибирования дальнейшей биоконверсии образовавшегося спирта. Способы преодоления некоторых из этих трудностей описаны выше.

В практической реализации биокаталитических процессов гидроксирования алканов пока нет необходимости, так как в промышленности основного органического синтеза широко используются традиционные химические способы получения спиртов (метанола – из синтез-газа, этанола – гидратацией этилена), которые по своим экономическим показателям, в частности, по стоимости конечного оксипродукта, пока находятся вне конкуренции.

VI. Заключение

Альтернативные биотехнологические способы осуществления прямого селективного окисления газообразных алканов C_1 – C_4 и алкенов C_2 – C_4 позволяют получать ценные оксипродукты — спирты и эпоксиды. Окислительные одностадийные превращения углеводородов могут протекать при участии бактериальных клеток газоассимилирующих микроорганизмов, обладающих необходимой ферментативной монооксигеназной активностью. Биокаталитические процессы отличаются малой энергоемкостью, поскольку они осуществляются в мягких условиях и при низких температурах (ниже 40°C), высокой селективностью (близкой к 100%), не зависящей от степени превращения исходного субстрата, и, самое главное, стереоспецифичностью. В составе образующегося оксипродукта может преобладать какой-то один оптически активный стереоизомер, что невозможно при проведении аналогичных химических процессов. Сегодня еще рано говорить о замене тяжелого органического синтеза

в промышленности окислительными биокаталитическими процессами, однако научные исследования в этой области, находящейся на стыке микробиологии и органической химии, достаточно актуальны и перспективны.

Литература

1. А. Сассон. *Биотехнология: достижения и перспективы*. Мир, Москва, 1987
2. K. Furuhashi. *Bio Sci. Ind., Jpn.*, **45**, 468 (1987)
3. K. Furuhashi. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **45**, 162 (1987)
4. A. M. Maitra. *Appl. Catal.*, **104**, 11 (1993)
5. R. Pitchai, K. Kleir. *Catal. Rev. -Sci. Eng.*, **28**, 13 (1986)
6. M. J. Brown, N. D. Parkyns. *Catal. Today*, **8**, 305 (1991)
7. H.-F. Liu, R.-S. Liu, K. Y. Liew, R. E. Johnson, J. H. Lunsford. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4117 (1984)
8. Ю. С. Мардашев, Г. Д. Казакова, Л. С. Ибраева. В кн. *Тез. докл. Всесоюз. конференции "Селективное окисление углеводородов и ресурсосбережение углеводородного сырья"*. Харьков, Харьковский политехн. ин-т. 1991. С. 53
9. R. K. Grasselli, G. Centi, F. Trifiro. *Appl. Catal.*, **57**, 149 (1990)
10. R. Zhao, Z. Xu, Z. Wang. *Petrochem. Technol. (China)*, **4**, 157 (1995)
11. С. В. Адельсон, Т. П. Вишнякова, Я. М. Паушкин. *Технология нефтехимического синтеза*. Химия, Москва, 1985
12. A. Q. H. Habets-Crutzen, L. E. S. Brink, C. G. van Ginkel, J. A. M. de Bont, J. Tramper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 245 (1984)
13. L. B., Jr. Wingard, R. P. Roach, O. Miyawaki, K. A. Egler, G. E. Klinzing, R. S. Silver, J. S. Brackin. *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 503 (1985)
14. A. Q. H. Habets-Crutzen, C. J. M. Carlier, J. A. M. de Bont, D. Wistuba, V. Schurig, S. Hartmans, J. Tramper. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **7**, 17 (1985)
15. P. S. Yarladda, L. F. Morton, N. R. Hunter, H. D. Gesser. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **27**, 252 (1988)
16. H. D. Gesser, N. R. Hunter, C. B. Prakash. *Chem. Rev.*, **85**, 235 (1985)
17. D. O. Mounford, Y. Pybus, R. Wilson. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 343 (1990)
18. P. K. Mehta, S. Mishra, T. K. Ghose. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 551 (1991)
19. S. Vaisman. *Biofutur*, **52**, 53 (1986)
20. В. Г. Дебабов. *Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **35**, 755 (1990)
21. Yosiki Tani. *Bio Sci. Ind., Jpn.*, **48**, 635 (1990)
22. C. A. G. M. Weijers, C. G. van Ginkel, J. A. M. de Bont. *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 214 (1988)
23. Е. Н. Кондратьева. *Хемолитотрофы и метилотрофы*. Изд-во МГУ, Москва, 1983
24. Е. И. Квасников, Ю. Р. Малашенко, В. А. Романовская. *Успехи микробиологии*, **9**, 125 (1974)
25. Ю. Р. Малашенко, В. А. Романовская, Ю. А. Тропченко. *Метан-окисляющие микроорганизмы*. Наука, Москва, 1978
26. I. G. Higgins, D. J. Best, R. C. Hammond. *Nature*, **286**, 561 (1980)
27. И. Б. Ившина, Р. А. Пшеничных, А. А. Оборин. *Пропанокисляющие родококки*. УНЦ АН СССР, Свердловск, 1987
28. Т. В. Коронелли. *Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов*. Изд-во МГУ, Москва, 1984
29. J. R. Vestal, J. J. Perry. *Can. J. Microbiol.*, **17**, 445 (1971)
30. Г. К. Скрыбин, Л. А. Головлева. *Использование микроорганизмов в органическом синтезе*. Наука, Москва, 1976
31. С.-Т. Hou. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, **4**, 145 (1986)
32. Р. И. Гвоздев, Н. П. Агентыева. *Биохимия и физиология метилотрофов*. Пушино, Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов, 1987
33. J. D. Lipscomb. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 371 (1994)
34. K. Furuhashi, A. Taoka, S. Uchida, S. Suzuki. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 39 (1981)
35. K. Furuhashi. *J. Agr. Chem. Soc., Jpn.*, **62**, 772 (1988)
36. J. A. M. de Bont, M. M. Attwood, S. B. Primrose, W. Harder. *FEMS Microbiol. Lett.*, **6**, 183 (1979)
37. T. Imai, H. Takigawa, S. Nakagawa, G.-J. Shen, T. Kodama, Y. Minoda. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1403 (1986)
38. D. Y. Stirling, H. Dalton. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 315 (1979)

39. S.Hartmans, J.A.M. de Bont, W.Harder. *FEMS Microbiol. Rev.*, **63**, 235 (1989)
40. C.-T.Hou, R.N.Patel, A.I.Laskin, N. Barnabe. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 127 (1979)
41. C.-T.Hou, P.N.Patel, A.I.Laskin, N.Barnabe. *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 267 (1980)
42. R.N.Patel, C.-T.Hou, A.I.Laskin, A.Felix, P.Derelanko. *J. Appl. Biochem.*, **5**, 121 (1983)
43. C.-T.Hou, R.N.Patel, A.I.Laskin, N.Barnabe, I.Barist. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 171 (1983)
44. N.R.Woods, J.C.Murrell. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 409 (1990)
45. J.A.M. de Bont, C.G. van Ginkel, J.Tramper, K.Ch.A.M. Luyben. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **5**, 55 (1983)
46. C.G. van Ginkel, H.G.J. Welten, J.A.M.de Bont. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2903 (1987)
47. R.S.Hamstra, M.R.Murris, J.Tramper. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 884 (1987)
48. C.G. van Ginkel, H.G.J.Welten, J.A.M. de Bont. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 334 (1986)
49. Wang Fulai, Zheng Jian, Wang Fang, Chen Jingru, Hu Xiao, Zhao Zhujie. *Acta Microbiol. Sin. (China)*, **33**, 129 (1993)
50. G.A.Kovalenko, V.D.Sokolovskii. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 522 (1992)
51. D.J.Leak, H.Dalton. *J.Gen. Microbiol.*, **129**, 3487 (1983)
52. G.A.Kovalenko, V.D.Sokolovskii. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **48**, 447 (1992)
53. C.-T.Hou, R.N.Patel, A.I.Laskin. *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 41 (1980)
54. A.Shigetoshi, O.Mitsufumi, O.Ichiro. *J. Mol. Catal.*, **49**, L65 (1989)
55. C.-T.Hou. *Ann. New York Acad. Sci.*, **434**, 541 (1986)
56. Gao Canzhu, Li Zhuben, Ning Zhizhong, Miao Dexun. *J. Mol. Catal. (China)*, **5**, 227 (1991)
57. А.К.Куликова, А.А.Безубов, А.М. Безбородов. *Прикл. биохимия и микробиология*, **29**, 512 (1993)
58. А.К.Куликова, Е.Б.Летунова, А.М.Безбородов. *Прикл. биохимия и микробиология*, **29**, 431 (1993)
59. M.Onodera, Y.Endo, N.Ogasawara. *Agr. Biol. Chem.*, **53**, 1947 (1989)
60. A.Q.H.Haberts-Crutzen, J.A.M. de Bond. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 434 (1987)
61. K.Furuhashi, M.Shintani, M.Takagi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 218 (1986)
62. B.G.Fox, W.A.Froland, J.E.Dege, J.D.Lipscomb. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10023 (1989)
63. O.Aspurger, K.Wirkner, H.-P.Kleber. *Biocatalysis*, **4**, 59 (1990)
64. E.J.Warburton, A.M.Magor, M.K.Trower, M.Griffin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **66**, 5 (1990)
65. J.M.Wyatt. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 20 (1984)
66. J.Colby, D.I.Stirling, H.Dalton. *Biochem. J.*, **165**, 395 (1977)
67. I.J.Higgins, R.C.Hammond, F.S.Sariaslani, D.Best, M.M.Davies, S.E.Tryhorn, F.Taylor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 671 (1979)
68. L.Alvarez-Cohen, P.L.McCarty. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228 (1991)
69. H.-C.Tsien, G.A.Brusseau, P.S.Hanson, L.P.Wackett. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3155 (1989)
70. P.Oldenhuis, J.Y.Oedzes, J.J. van der Waarde, D.B.Janssen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 7 (1991)
71. C.-T.Hou. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 1 (1984)
72. O.Miyawaki, B.Wingard, Jr., J.S.Brackin, R.S.Silver. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 343 (1986)
73. K.Furuhashi. *Chemistry (Jpn.)*, **42**, 672 (1987)
74. A.C. van der Linden. *Biochim. Biophys. Acta.*, **77**, 157 (1963)
75. Пат. 0082006 Европа (1983)
76. S.L.Neileman, J.Geigert. *Biotechnol. Biochem. Soc. Symp.*, **48**, 39 (1982)
77. S.L.Neileman. *Hydrocarbon Proces.*, **59**, 135 (1980)
78. S.W.May, R.D.Schwartz, B.J.Abbott, O.R.Zaborsky. *Biochim. Biophys. Acta.*, **403**, 245 (1975)
79. A.Q.H.Habets-Crutzen, J.A.M. de Bont. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 428 (1985)
80. Gao Canzhu, Li Zhuben, Ning Zhizhong, Miao Dexun. *J. Mol. Catal. (China)*, **4**, 291 (1990)
81. Пат. 4348476 США (1982)
82. D.Frense, P.Miethe, M.Langwald, K.-H.Mohr. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 93 (1992)
83. L.E.S.Brink, J.Tramper. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1258 (1985)
84. L.E.S.Brink, J.Tramper. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **9**, 612 (1987)
85. L.E.S.Brink, J.Tramper. *J.Chem. Technol. Biotechnol.*, **37**, 21 (1987)
86. L.E.S.Brink, J.Tramper, K. van Triet, K.Ch.A.M.Luyben. *Anal. Chim. Acta.*, **163**, 207 (1984)
87. L.E.S.Brink, J.Tramper. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 334 (1986)
88. L.E.S.Brink, J.Tramper. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 281 (1986)
89. J.Tramper, L.E.S.Brink, R.S.Hamstra, J.A.M. de Bont, A.Q.H.Habets-Crutzen, C.G. van Ginkel. In *Proceedings of the 3rd European Congress Biotechnology*, Munchen, Weinheim, A.O.1984. P.II269
90. K.Furuhashi, S.Uchida, I.Karube, S.Suzuki. *Enzyme Eng.*, **6**, 139 (1982)
91. Г.А.Коваленко, В.Д.Соколовский. *Биотехнология*, **3**, 612 (1987)
92. R.A.Messing, R.A.Opperman. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 49 (1979)
93. V.D.Sokolovskii, G.A.Kovalenko. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 916 (1988)
94. J.Klein, H.Ziehr. *J.Biotechnol.*, **16**, 1 (1990)
95. Д.Г.Звягинцев. *Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями*. Изд-во МГУ, Москва, (1979)
96. С.В.Ельнич, В.Б.Пичко, Л.В. Логиненко. *Биотехнология*, **4**, 89 (1988)
97. J.L.Galazzo, J.E.Bailey. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1283 (1989)
98. C.Fortin, J.-Ch.Vuillemard. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 913 (1990)
99. C.A.G.M.Weijers, A. de Haan, J.A.M. de Bont. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 337 (1988)
100. C.A.G.M.Weijers, J.A.M. de Bont. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **13**, 306 (1991)
101. S.Masahiro, O.Ichido. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **7**, 533 (1990)
102. S.Masahiro, O.Ichido. *J. Mol. Catal.*, **64**, L23 (1991)
103. L.R.Brown, R.J.Strawinski, C.S. McCleskey. *Can. J. Microbiol.*, **10**, 791 (1964)
104. W.Ashraf, A.Mihdhir, J.C.Murrell. *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 1 (1994)
105. C.-T.Hou, R.N.Patel, A.I.Laskin, I.Marczak, N.Barnabe. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 107 (1981)
106. R.N.Patel, C.-T.Hou, A.I.Laskin, A.Felix, P. Derelanko. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 720 (1980)
107. C.-T.Hou, R.N.Patel, A.I.Laskin, I.Marczak, N.Barnabe. *Dev. Ind. Microbiol.*, **22**, 467 (1981)
108. R.N.Patel, C.-T.Hou, A.I.Laskin, A.Felix, P.Derelanko. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 727 (1980)
109. M.Onodera, Y.Endo, N.Ogasawara. *Agr. Biol. Chem.*, **53**, 1431 (1989)
110. H.B.Lukins, J.W.Foster. *J. Bacteriol.*, **85**, 1074 (1963)
111. C.E.Cerniglia, W.T.Brevins, J.J.Perry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 764 (1976)

SELECTIVE OXIDATION OF GASEOUS HYDROCARBONS BY BACTERIAL CELLS

G.A.Kovalenko*K.G.Boreskov Institute of Catalysis, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences**5, prosp. akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(382-2)35-5766*

The data on direct selective oxidation of gaseous C_1-C_4 alkanes and C_2-C_4 alkenes into the valuable oxy-products (alcohols, epoxides, methylketones) by gas-assimilating bacteria are reviewed. Idle bacterial cells grown on the gaseous hydrocarbons have monooxygenase activity: they enable the oxygen atom insertion into the hydrocarbon molecule resulting in oxy-product. This process occurs under extremely mild conditions, with high selectivity and stereospecificity, without toxic side-product formation. Some aspects of the oxidative biocatalytical processes implementation are considered, namely, the regeneration of monooxygenase co-factors, decrease of toxic effect of oxy-product produced, immobilization of microorganisms to obtain an active stable heterogeneous biocatalysts for direct partial oxidation of hydrocarbons.

Bibliography — 111 references.

Received 15th February 1996