

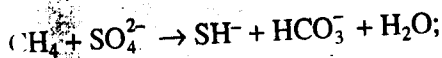
15+547211

МЕТАНОГЕНЕЗ ОБРАТИМ: ОБРАЗОВАНИЕ АЦЕТАТА ПРИ КАРБОКСИЛИРОВАНИИ МЕТАНА БАКТЕРИЯМИ МЕТАНОВОГО БИОЦЕНОЗА

© 1999 г. Академик А. Е. Шилов, Е. М. Колдашева, С. В. Коваленко, Н. П. Акентьева, С. Д. Варфоломеев, С. В. Калужный, В. И. Склад

Поступило 10.11.98 г.

яду с хорошо известным ферментативным окислением метана метанооксилюющими бактериями с участием фермента метанмонооксидазы, по-видимому, существует природный процесс, где акцептором электронов выступает, например, сульфат и реакция идет по схеме



$$\Delta G^{298} = -25.10 \text{ кДж/моль.}$$

этот процесс обнаруживается, например, в осадках дна океана, но природа его пока неясна, неизвестны и бактерии, которые окисляют метан этим путем, как неизвестна и природа ферментов, которые участвуют в этом процессе. Что касается других алканов, то в недавнем сообщении утверждается, что нормальные алканы $\text{C}_6\text{--C}_{16}$, содержащиеся в нефти, окисляются анаэробными термофильными сульфатредуцирующими бактериями (штамм TD3).

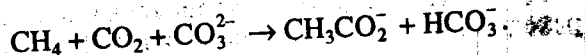
Некоторые представления о возможном механизме активации и окисления метана в анаэробных условиях можно, по-видимому, получить, наблюдая обратный окислению хорошо известный процесс биологического образования метана (метаногенез), механизм которого в общих чертах изучен. Дело в том, что этот процесс, вероятно, частично обратим. Есть указание [2], что параллельно с образованием метана происходит частичное окисление: в присутствии метана, меченого углеродом ^{14}C , наблюдается образование некоторого количества меченого диоксида углерода $^{14}\text{CO}_2$. Более того, в случае бактерий, способных образовывать метан из ацетата и метанола, в присутствии метана $^{14}\text{CH}_4$ в продуктах, меченных по углероду, наблюдаются именно эти

вещества. По отношению к количеству образуемого метана количество одновременно окисляемого метана $^{14}\text{CH}_4$ невелико (между 0.3 и 0.001%) и зависит от используемого штамма бактерий.

Для более уверенного вывода об окислении метана под действием метанобразующих бактерий необходимы прямые опыты: в принципе включение ^{14}C из метана в исходные реагенты в процессе метаногенеза может происходить путем каких-то обменных реакций, хотя обмен ^{14}C между метаном и CO_2 или между метаном и ацетатом (метанолом) не кажется очень вероятным. Мы решили провести прямые эксперименты с повышением давления метана для наблюдения реакции его анаэробного окисления под действием диоксида углерода.

В качестве биокаталитической системы использовали гранулированный ил, представляющий собой смешанную культуру различных микроорганизмов с преобладанием метанобразующих бактерий *Methanosarcina* и *Methanosaeta* (*Methanotherix*). Реакцию проводили в водном растворе бикарбоната натрия при давлении метана до 100 атм и температуре до 37°C . В контрольных опытах метан заменяли на аргон, а раствор бикарбоната натрия — на фосфатный буфер с соответствующим значением pH. Уксусную кислоту определяли хроматографически.

На рис. 1 приведены зависимости образования ацетата от времени термостатирования при pH от 7.8 до 8.5. На рис. 2 и 3 показаны зависимости выхода ацетата от давления метана и концентрации бикарбоната соответственно. Для сравнения приведены результаты контрольных опытов под аргонном или с заменой бикарбоната на фосфат. Можно видеть, что скорость реакции пропорциональна концентрации метана и имеет более сложную зависимость от концентрации бикарбоната. Полученные данные не оставляют сомнения в том, что в выбранных условиях происходит карбоксилирование метана в соответствии со схемой:



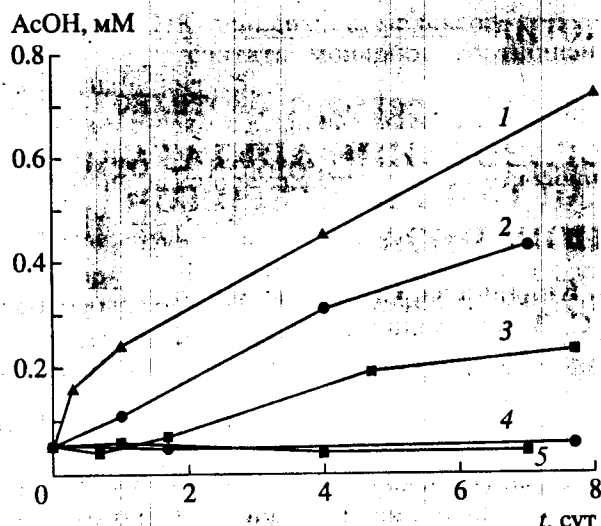


Рис. 1. Зависимость выхода ацетата под действием бактерий от времени термостатирования при 37°C в водном растворе бикарбоната натрия (кривые 1-4) или фосфатном буфере (5) при pH от 7.8 до 8.5, давления метана (1-3, 5) или аргона (4) 100 атм. 1 - pH 8.5 (0.13 M NaHCO₃); 2, 5 - pH 7.8 (0.1 M NaHCO₃ на минеральной среде); 3-4 - pH 7.8 (0.037 M NaHCO₃ + CO₂).

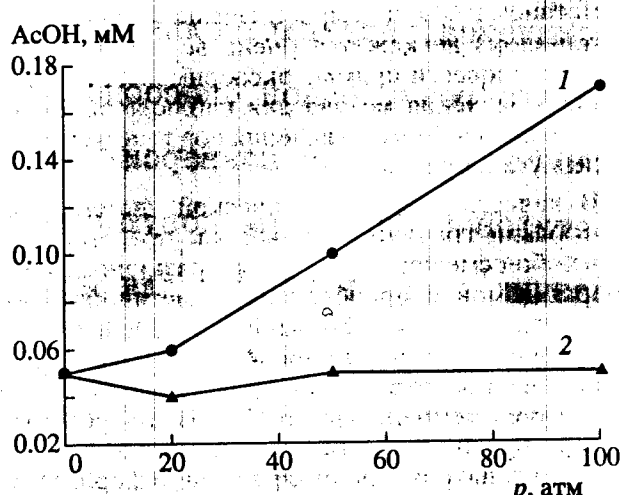


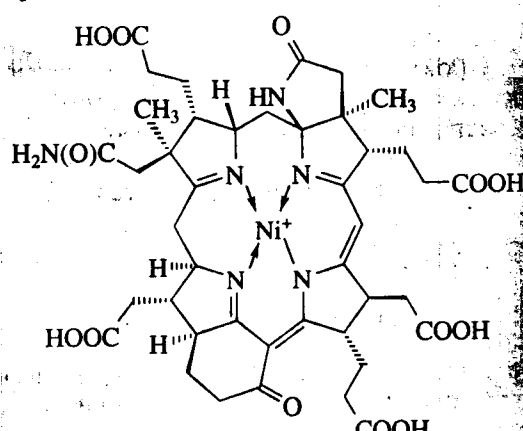
Рис. 2. Зависимость выхода ацетата через 5 сут термостатирования бактерий при 37°C в водном растворе бикарбоната натрия (0.1 M NaHCO₃, pH 8.25) от давления метана (1) и аргона (2).

Участие OH⁻ в выбранном интервале pH позволяет сделать реакцию карбоксилирования термодинамически возможной ($\Delta G^{298} = -15.73$ кДж/моль). Проведена экспериментальная оценка энергии активации, составившая 64.5 кДж/моль. Реакция карбоксилирования в кислых средах (pH < 5) с образованием уксусной кислоты термодинамически неблагоприятна ($\Delta G^{298} = 15.9$ кДж/моль). В сильнощелочных средах (pH > 9) диоксид углерода переходит в бикарбонат и карбонат, для которых

взаимодействие с метаном становится кинетически маловероятным, хотя и благоприятным термодинамически ($\Delta G^{298} = -7.04$ кДж/моль для реакции с карбонатом). Кроме того, при pH выше 9-9.5 происходит разрушение бактериальной биомассы с выделением свободного ацетата.

Полученные результаты вместе с предполагаемым механизмом метаногенеза позволяют предложить механизм обратной ему реакции активации метана и его карбоксилирования.

Известно, что финальная стадия метаногенеза включает участие так называемого фактора F₄₃₀ - порфиноидного комплекса никеля, активного центра фермента метил-S-коэнзим-M-метилредуктазы:



Фактор F₄₃₀ по всем данным образует метильный комплекс никеля (по-видимому, содержащий фрагмент Ni-CH₃), реакция которого с протонами ведет к образованию метана [3]:



Исходя из обратимости этой реакции, можно сделать вывод, что активация метана происходит на комплексе Ni^{II} по механизму метатезиса:



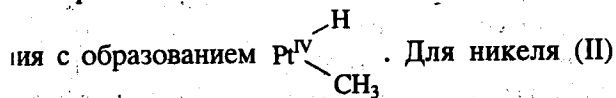
с одновременным депротонированием метана с образованием (возможно, молекулой воды, находящейся поблизости). В присутствии свободного CO₂ идет его внедрение по связи Ni-CH₃ и образование ацетата.

Зависимость скорости процесса от концентрации CH₄ позволяет предположить, что образование Ni-CH₃ является определяющей скоростью стадией. В случае диоксида углерода можно предположить, что образование комплекса с Ni^{II} препятствует дальнейшей реакции с метаном, что объясняет замедление реакции и уменьшение выхода при высоких концентрациях CO₂.

Полученные результаты позволяют предположить аналогичный механизм активации метана и других углеводородов в случае анаэробного окисления алканов. Небольшие изменения редокс-потенциала системы при учете обратимости

акции Ni^{II} по C-H-связи позволяют направить процесс в сторону окисления. Таким образом, комплекс Ni^{II} мог бы также включаться в активный центр ферментов, анаэробно окисляющих водороды, хотя порфиноидное окружение в этом случае, как в факторе F_{430} , естественно, не является необходимым.

Отметим, что электронная конфигурация Ni^{II} аналогична электронной конфигурации Pt^{II} , комплексов которой была впервые обнаружена активация алканов, включая метан, в водных растворах [4]. В случае Pt^{II} реакция, по-видимому, обычно происходит как окислительное присоединение, хотя энергия активации метатезиса (реакции одновременным отщеплением протона основания — например, Cl^- в координационной сфере Pt^{II} и образованием фрагмента $Pt^{II}-CH_3$) возможно, близка к энергии активации окислительного присоединения с образованием Pt^{IV} .



Окислительное присоединение маловероятно, хотя есть указание, что такой процесс происходит в случае палладия (II) [5]. Что касается внедрения оксида углерода по связи металл-углерод, то в литературе [6] отмечается, что эта реакция, видимо, берет место для синтетического метильного комплекса Ni^{II} с тетраметилцикломом.

Металлоорганическая химия в водных растворах в последнее время привлекает все большее внимание исследователей. Можно рассчитывать на обнаружение в будущем аналогичной реакции метана и диоксида углерода с участием синтетических комплексов. Следует отметить, что нам известно только одно сообщение о карбоксилировании метана диоксидом углерода [7], однако механизм этой реакции (ацетат палладия, $K_2S_2O_8$, дифторуксусной кислоте при $80^\circ C$) имеет, очевидно, радикальный характер.

Авторы выражают благодарность А.Ф. Чернову, Е.И. Карасевич и акад. И.И. Моисееву за одобрительное обсуждение результатов.

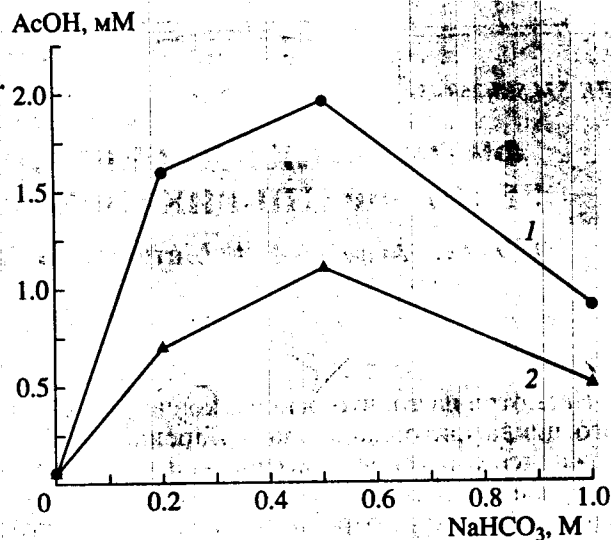


Рис. 3. Зависимость выхода ацетата через 7 сут термостатирования бактерий в водном растворе бикарбоната натрия при pH 8.1 и $37^\circ C$ от концентрации $NaHCO_3$ и давления 100 атм метана (1) и аргона (2).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 96-03-32906).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rueter P., Rabus R., Wilkes H. et al. // Nature. 1994. V. 372. № 6505. P. 455-458.
2. Zehnder A.J.B., Brock T.D. // J. Bacteriol. 1979. V. 137. № 1. P. 420-432.
3. Berkessel A. // Bioorg. Chem. 1991. V. 19. № 1. P. 101-115.
4. Гольдшлегер Н.Ф., Тябин М.Б., Шилов А.Е., Штейнман А.А. // ЖФХ. 1969. Т. 43. № 8. С. 2174-2175.
5. Vedernikov A.N., Kuramshin A.I., Solomonov B.N. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994. № 1. P. 121-122.
6. D'Aniello M.J., Jr., Barefield E.K. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 6. P. 1610-1611.
7. Fujiwara Y., Takaki K., Taniguchi Y. // Syn. Lett. 1996. № 7. P. 591-599.