

На правах рукописи

ИБРАГИМОВА АННА РИМОВНА

**РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭНАН-
ТИОСЕЛЕКТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ
КАРБОНИЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ**

Специальность 03.00.23 – “Биотехнология”

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук**

УФА - 2002

Работа выполнена в Уфимском государственном нефтяном техническом университете.

- Научные руководители:** доктор химических наук, профессор
Зорин Владимир Викторович;

кандидат биологических наук, доцент
Петухова Надежда Ивановна.
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор
Вахитов Венер Абсатарович;

кандидат технических наук
Прищепов Федор Александрович.
- Ведущая организация** Институт биологии Уфимского научного центра РАН.

Защита состоится “18” декабря 2002 года в 14³⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.289.06 при Уфимском государственном нефтяном техническом университете по адресу: 450062, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского государственного нефтяного технического университета.

Автореферат разослан 18 ноября 2002 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самойлов Н. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Природные биологически активные вещества, их синтетические аналоги и производные представляют большой интерес для создания современных лекарственных препаратов и экологически чистых средств защиты растений. Особенностью большинства природных биологически активных веществ является специфическая стереохимия, обусловленная наличием двойных связей и хиральных центров определенной конфигурации. Создание методов получения синтетических аналогов природных биологически активных веществ предполагает осуществление асимметрического синтеза или использования оптически активных блоков. Чисто химические подходы для решения этой задачи часто оказываются малоэффективными и нецелесообразными. Наиболее перспективным является микробиологический подход, основанный на использовании стереонаправленной биотрансформации органических соединений.

Важное место среди процессов стереонаправленной биотрансформации занимает энантиоселективное восстановление карбонильных соединений с помощью микроорганизмов в оптически активные спирты, оксикислоты и их эфиры, необходимые для получения низкомолекулярных биорегуляторов и стереорегулярных полимеров.

Известны микроорганизмы, проявляющие высокую энантиоселективность при восстановлении отдельных карбонилсодержащих соединений. Однако, большинство из них не способно осуществлять биотрансформацию с достаточно высокой скоростью и выходом целевого продукта. Часто имеет место и обратная ситуация, когда микроорганизмы проявляют высокую карбонилредуктазную активность при низкой энантиоселективности, поскольку, как правило, в клетках имеется несколько ферментов, способных трансформировать субстрат в продукты противоположной конфигурации. Разработка высокоселективных методов восстановления карбонилсодержащих соединений требует поиска способов стереоконтроля трансформации путем модификации субстрата, подбора ингибиторов «мешающих» ферментов, оптимизации условий реакции и выращивания микроорганизмов.

В связи с этим поиск новых более эффективных микроорганизмов-трансформаторов, обладающих широкой субстратной специфичностью и условий, в которых они способны осуществлять энантиоселективное восстановление прохиральных карбонилсодержащих предшественников с высоким выходом ценных оптически активных синтонов, является задачей актуальной.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с заданием Министерства образования РФ по тематическому плану НИР Уфимского государственного нефтяного технического университета (1998-2002 гг.); Федеральной целевой программой «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки» (1997-2001 гг.).

Цель работы. Разработка методов энантиоселективного восстановления карбонилсодержащих соединений с помощью клеток микроорганизмов, обладающих карбонилредуктазной активностью, для получения ценных оптически активных синтонов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- скрининг микроорганизмов, обладающих высокой карбонилредуктазной активностью и способностью к энантиоселективному восстановлению прохиральных карбонилсодержащих предшественников;
- исследование морфологических, физиолого-биохимических и патогенных свойств практически важных микроорганизмов;
- подбор условий синтеза (S)- и (R)-этил-3-оксибутирата путем восстановления этилацетоацетата с помощью клеток микроорганизмов;
- поиск способов стереоконтроля синтеза (S)- и (R)-этил-3-оксибутирата микроорганизмами;
- разработка энантиоселективных биокатализаторов восстановления на основе клеток микроорганизмов;
- исследование условий эффективной работы биокатализаторов;
- исследование синтетических возможностей полученных биокатализаторов.

Научная новизна. Найжены и идентифицированы новые энантиоселективные штаммы *Pichia* sp. 80-11 и *Metschnikowia* sp. 84-13, на основе которых созданы стереоселективные биокатализаторы для получения оптически активных оксикислот и спиртов путем восстановления прохиральных карбонилсодержащих предшественников. Разработаны научно обоснованные методы синтеза оптически активных S- и R-энантиомеров этил-3-оксибутирата с использованием созданных биокатализаторов. Определены оптимальные параметры работы биокатализаторов. Впервые предложен эффективный метод синтеза S-этил-3-оксибутирата с помощью иммобилизованных клеток штамма *Pichia* sp. 80-11, позволяющий получать продукт высокой оптической чистоты. Разработаны научно обоснованные методы стереоконтроля и регенерации биокатализатора.

Практическая значимость. Разработаны высокостереоселективные биокатализаторы на основе штаммов *Pichia* sp. 80-11 и *Metschnikowia* sp. 84-13, осуществляющих энантиоселективное восстановление этилацетоацетата в S- и R-энантиомеры этил-3-оксибутирата высокой оптической чистоты. Созданы препаративные методы синтеза высокочистых (S)- и (R)- этил-3-оксибутирата (не менее 98 %ee). Полученный оптически чистый S-этил-3-оксибутират был использован в лаборатории биорегуляторов насекомых ИОХ УНЦ РАН для синтеза пестицидов четвертого поколения - феромонов насекомых - 2S-тридецилацетата, 2S-тридец-10E-енилацетата и (S)-1-метилбутиловых эфиров 2-метил- и 2,4-диметилпент-2E-еновых кислот, позволяющих эффективно и экологически безопасно осуществлять защиту сельскохозяйственных культур от насекомых-вредителей - плодовой мушки (*Drosophila mulleri*, *Drosophila buscki*), гессенской мухи (*Mayetiola destructor*) и зернового точильщика (*Rhyzopertha dominica*).

Методика энантиоселективного восстановления этилацетоацетата используется в учебном процессе УГНТУ при подготовке специалистов по специальности 07.01.00 – «Биотехнология».

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Второй Международной конференции «Актуальные тенденции в органическом синтезе на пороге новой эры» (Санкт-Петербург, июнь 1999г.); XXXVII международной Научной студенческой конференции (Новосибирск, апрель 1999 г.); конференции молодых ученых (Уфа, апрель 1999); Международной научно-практической кон-

ференции «Сервис большого города» (Уфа, май, 1999 г.); XII международной конференции по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-99», (Уфа-Москва, сентябрь, 1999 г.); Республиканской научной конференции «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины», (Уфа, октябрь 1999 г.); Заочной научно-практической конференции "Биотехнология ФЦП "Интеграция"", (Санкт – Петербург, июнь 1999 г.); XXXVIII международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2000 г.); XIII международной конференции по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-2000»; (Уфа-Москва, 2000), XXXXIX международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2001 г.); XIX международной конференции по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-2001», (Уфа-Москва, 2001) ; Всероссийской заочной конференции «Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях» (Тверь, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и тезисы 16 докладов.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы (1 глава), описание объектов и методов исследования (2 глава), экспериментальную часть и обсуждение результатов (3 глава), выводы и список цитируемой литературы, содержащей 158 ссылок. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста и содержит 20 рисунков и 19 таблиц.

Для количественного определения концентраций органических субстратов и продуктов реакции, их идентификации и оценки оптических свойств применяли методы газожидкостной хроматографии, хроматомас-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии и поляриметрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Скрининг микроорганизмов с карбонилредуктазной активностью

Поиск микроорганизмов, обладающих карбонилредуктазной активностью, осуществляли среди штаммов, выделенных из почвенных образцов, взятых с различных участков лесопарковой зоны г. Уфы, нефтеперерабатывающих производств Республики Башкортостан и нефтепромыслов Сибири. Кроме того, в качестве потенциальных биокатализаторов испытывались товарная биомасса пекарских дрожжей, выпускаемая на уфимском производственном объединении "Башпиво", а также свежeverащенные клетки этих дрожжей и дрожжей *Candida utilis* У-654, используемых при производстве БВК.

В качестве трансформируемого субстрата был использован этилацетоацетат (ЭАА), оптически активные продукты восстановления которого, S-этил-3-оксибутират (S-ЭОБ) и R-этил-3-оксибутират (R-ЭОБ), применяются в синтезе феромонов насекомых, используемых для защиты сельскохозяйственных культур, синтезе шовных материалов для хирургии, биоразлагаемых полимеров, практически ценных биорегуляторов (карбомицина В, RR-пиренофорина, грамицина А, сулькатола, коллетодиола и ресифеолида), а также материалов-антиоксидантов для пищевой промышленности.

В результате тестирования 102 дрожжевых штаммов в следующих условиях: 0,05 М фосфатный буфер, рН = 7,0; субстрат – 5 г/л; биомасса – 8,5-15 мг(асв)/мл; аэробные условия, температура реакции 30-32 °С, время реакции – 4 ч,

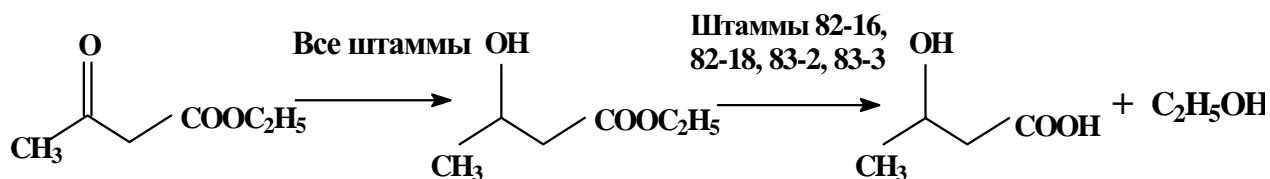
были выявлены 17 штаммов, способных конвертировать ЭАА более чем на 40% (табл. 1).

Таблица 1

Результаты восстановления ЭАА микроорганизмами

Штамм	Конверсия ЭАА, %	Выход ЭОБ, %	Штамм	Конверсия ЭАА, %	Выход ЭОБ, %
80-1	76,0	75,1	81-13	90,2	88,6
80-2	80,4	69,5	82-2	45,7	44,2
80-11	100	99	82-16	96,0	20,1
80-12	74,3	70,8	82-18	85,4	15,7
81-1	80,0	77,5	83-2	77	21,4
81-2	50,7	49,7	83-3	100	19,7
81-3	40,0	35,9	84-13	100	90,8
81-11	79,2	78,8	85-13	69,1	67,2
81-12	99,3	97,3	Candida utilis У-654	89	88
Пекарские дрожжи товарные	30,4	29,5			

При этом большинство штаммов накапливают в процессе трансформации ЭОБ с высоким количественным выходом. Исключение составляют штаммы, аккумулирующие продукт в небольших количествах и катализирующие его гидролиз:



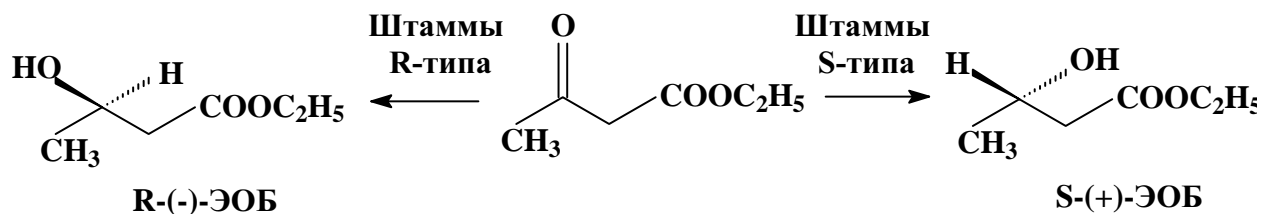
Исследование оптических свойств продукта трансформации показало, что все найденные штаммы осуществляют восстановление ЭАА энантиоселективно (табл. 2).

Таблица 2

Оптические свойства ЭОБ, синтезированного исследуемыми штаммами

Штаммы	$[\alpha]_D$ (Конфигурация)	Оптическая чистота, % ee	Штаммы	$[\alpha]_D$ (Конфигурация)	Оптическая чистота, % ee
80-1	-34,5 (R)	75,0	81-13	+30,2 (S)	70,2
80-2	+37,4 (S)	87,0	82-2	+6,5 (S)	15,1
80-12	+18,2 (S)	42,4	82-16	+7,4 (S)	17,3
80-11	+40,9 (S)	88,0	82-18	+9,4 (S)	21,9
81-1	-25,8 (R)	56,0	83-2	+32,3 (S)	75,0
81-2	+25,3 (S)	62,6	83-3	+30,9 (S)	72,0
81-3	+17,4 (S)	58,7	84-13	-33,2 (R)	72,3
81-11	+21,0 (S)	48,9	85-13	-9,1 (R)	19,8
81-12	+38,6 (S)	85,7	Candida utilis У-654	+ 30,2(S)	65,8
Пекарские дрожжи	+5 (S)	11			

Было установлено, что большинство штаммов синтезируют S- ЭОБ и только 4 штамма образуют R- ЭОБ.



Исследование кинетики для количественной оценки карбонилредуктазной активности микроорганизмов показало, что наиболее активно восстанавливают ЭАА штаммы 80-11, 81-12 и 84-13 (рис.1).

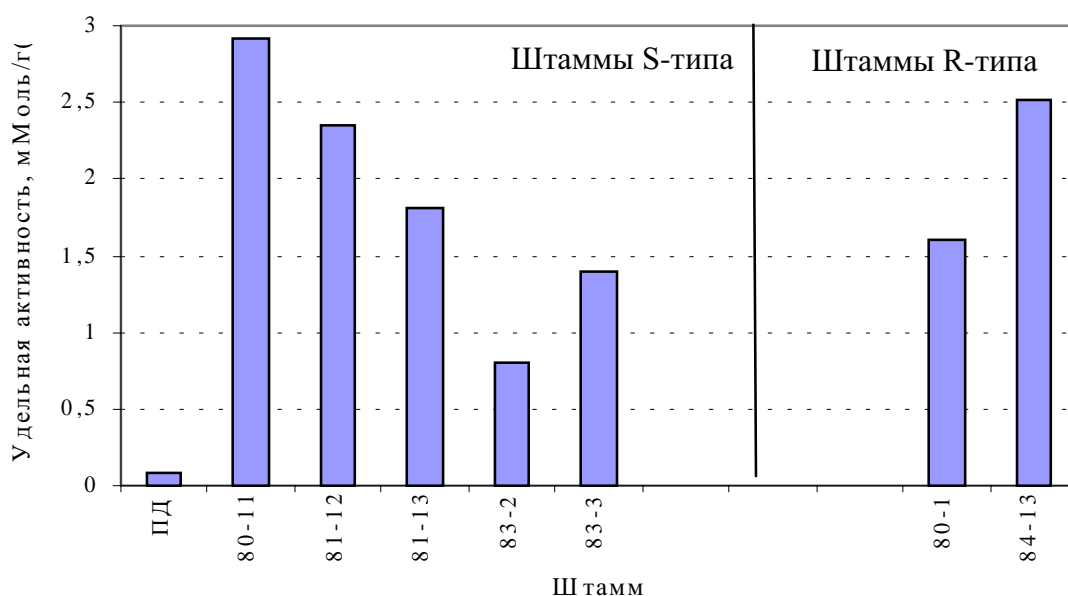


Рис. 1. Удельная активность восстановления ЭАА наиболее активными штаммами

Следует отметить, что их активность превышала редуктазную активность биомассы пекарских дрожжей в 30-36 раз.

Таким образом, наиболее перспективными являются два штамма S-типа (80-11, 81-12) и один штамм R-типа (84-13).

2. Идентификация и исследование патогенных свойств перспективных штаммов

На основании результатов исследования основных морфологических и физиолого-биохимических признаков найденные микроорганизмы были идентифицированы как *Pichia sp.* 80-11, *Candida sp.* 81-12 и *Metschnikowia sp.* 84-13.

Испытание этих штаммов на патогенность, выполненное сотрудниками Института экологии труда и гигиены человека Республики Башкортостан показало, что они не обладают патогенными для человека и животных свойствами.

3. Исследование восстановления ряда карбонилсодержащих соединений

Для наиболее перспективных штаммов микроорганизмов, выявленных по характеристикам восстановления ЭАА, была произведена оценка способности к восстановлению ряда карбонилсодержащих субстратов различных видов – эфиров оксокарбоновых кислот (ЭАА), диалкилкетонов (гептанон-2, (3S)-3,7-диметил-6-октенон, метилвторбутилкетон), хлорсодержащих соединений циклопентанового ряда (8-гидрокси-1,4-диокса-6,8,9-трихлор-спиро/4,4/нон-6-ен-8-он, циклопентанон), циклических кетосодержащих (3,3-диметил-2-оксо-бутиролактон). Исследование выполнялось в стандартных условиях: 0,05 М фосфатный буфер, pH = 7,0; субстрат – 5 г/л; биомасса – 8,5 мг(асв)/мл; аэробные условия, температура реакции 32 °С, время реакции – 4 ч..

Производные циклопентанового ряда являются важными синтонами в синтезе простаноидов, простагландинов и противоопухолевых препаратов. Установлено, что исследуемые штаммы обладают высокой карбонилредуктазной активностью относительно 3,3-диметил-2-оксо-бутиролактона, циклопентанона и метилвторбутилкетона. При восстановлении 1,4-диокса-6,7,9-трихлорспиро/4.4/нон-6-ен-8-она, несмотря на 47% конверсию, 1,4-диокса-6,7,9-трихлорспиро/4.4/нон-6-ен-8-ола в реакционной смеси обнаружено не было (табл. 3). Возможно, в данном случае имеет место быстрая дальнейшая конверсия образующегося продукта или другой, невозстановительный путь трансформации субстрата. Кроме того, наличие в молекуле этого соединения, активного хлора не исключает его взаимодействия с аминными группами белков.

Исследование оптической чистоты продуктов восстановления показало, что 3,3-диметил-2-оксо-бутиролактон восстанавливается с низкой энантиоселективностью на уровне 10 %ее, в то же время более высокие значения оптической чистоты продуктов получены в случае восстановления диалкилкетонов (около 70 %ее).

Таким образом, полученные результаты показывают возможность использования указанных штаммов для энантиоселективного восстановления карбонилсодержащих соединений.

4. Поиск методов подавления побочных реакций биовосстановления ЭАА

Согласно современным требованиям оптическая чистота синтонов низкомолекулярных биорегуляторов должна быть не менее 95 % ее. В связи с этим был осуществлен поиск способа подавления активности «мешающего» фермента, катализирующего образование нецелевого энантиомера в процессах восстановления ЭАА штаммом *Pichia* sp. 80-11 (S-типа) и *Metschnikowia* sp. 84-13 (R-типа), с помощью известных химических ингибиторов карбонилредуктаз, а также термической предобработкой биомассы.

4.1 Влияние химических ингибиторов

Было исследовано действие на активность микроорганизмов аллилового спирта, избирательно подавляющего активность лактатдегидрогеназы пекарских дрожжей, бромистого аллила, ингибирующего алкогольдегидрогеназу этих микроорганизмов, капроновой кислоты и стеарата натрия, подавляющих активность синтетазы жирных кислот, также участвующей в восстановлении ЭАА у пекарских дрожжей (Faber, 1997; Nakamura, 1991).

Исследование оптических свойств продуктов трансформации ЭАА показало, что ингибиторы вызывают некоторое изменение селективных свойств обоих штаммов, однако продукт требуемой чистоты в большинстве случаев получить не удалось (табл. 4).

Таблица 4

Влияние ингибиторов на процесс биокаталитического восстановления ЭАА в стандартных условиях

Ингибитор	<i>Pichia</i> sp. 80-11			<i>Metschnikowia</i> sp. 84-13		
	Концентрация ингибитора, г/л	Выход, %	Оптическая чистота S-ЭОБ, %	Концентрация ингибитора, г/л	Выход, %	Оптическая чистота R-ЭОБ, %
Без ингибитора	0	99	88	0	76	72,3
Аллиловый спирт	1	28,9	55	0,25	50	85,6
Бромистый аллил	0,25	42,0	99	0,05	50	64
Стеарат натрия	1	100	84,7	-	-	-
Капроновая кислота	1	100	57	-	-	-

- не исследовались

Высокая оптическая чистота ЭОБ была показана только для штамма *Pichia* sp. 80-11 с использованием бромистого аллила. Однако, применение такого подхода для увеличения стереоселективности восстановления ЭАА весьма проблематично, поскольку реакция значительно замедляется, и максимальный выход продукта не превышает 42 %.

4.2 Температурная предобработка биомассы *Pichia* sp. 80-11

При термостатировании биомассы *Pichia* sp. 80-11 при 52 °С разница в стабильности ферментов не была обнаружена. Наблюдаемое в процессе нагрева снижение активности не оказывает ярко выраженного влияния на оптическую чистоту образующегося S-ЭОБ, что свидетельствует о неселективном действии тепловой предобработки на биокатализатор.

Попытка повлиять на активность «мешающего» фермента путем воздействия СВЧ-излучения в течение 17 с в СВЧ-поле (разогрев не превышал 52 °С), также оказалась неэффективной. Селективность процесса снизилась до 46,5 %ее, что возможно, связано с инактивацией фермента, катализирующего целевую реакцию.

Таким образом, полученные данные показывают, что использование таких подходов для увеличения стереоселективности восстановления ЭАА неэффективно.

5. Поиск оптимальных условий восстановления этилацетоацетата исследуемыми микроорганизмами

Для повышения селективности процесса было исследовано влияние рН среды, температуры, концентрации субстрата и биомассы на активность и стереоселективность восстановления ЭАА, поскольку «целевые» и «мешающие» ферменты могут отличаться друг от друга оптимальными условиями проявления своей активности.

5.1 Зависимость от температуры

При исследовании температурной зависимости восстановления ЭАА исследуемыми микроорганизмами было установлено, что в области высоких и низких температур образуются продукты низкой оптической чистоты.

Наибольшая оптическая чистота продукта в сочетании с высокой карбонилредуктазной активностью наблюдается в обоих случаях в области температур от 32 до 38 °С.

5.2 Зависимость от pH

В результате исследования pH-зависимости в области значений кислотности среды от 6,0 до 8,0 было установлено, что оптимум карбонилредуктазной активности биомассы штамма *Pichia* sp. 80-11 и максимальная чистота, синтезируемого им продукта находится в области 7,5. В случае штамма *Metschnikowia* sp. 84-13 обнаружено, что эти параметры смещены в область pH 6,0 - 6,5 (Рис. 2 Б).

5.3 Влияние концентрации субстрата

Исследование влияния начальной концентрации субстрата на восстановление ЭАА, показало, что активность биомассы *Metschnikowia* sp. 84-13 ингибируется высокими концентрациями кетоэфира. При этом наибольшая активность достигается при 5 г/л ЭАА (рис. 2В).

В случае трансформации ЭАА штаммом *Pichia* sp. 80-11 токсичное действие субстрата на активность биомассы не наблюдалось (рис. 2В). Однако, через 2 - 3 ч реакции в вариантах с концентрацией ЭАА более 5 г/л начиналось снижение скорости реакции.

Исследование оптической чистоты продуктов, полученных при трансформации ЭАА, вносимого в реакционную смесь в концентрациях от 2,5 до 15 г/л, позволило выявить, что для *Metschnikowia* sp. 84-13 этот показатель возрастает с увеличением концентрации субстрата от 2,5 до 5 г/л и стабилизируется на уровне 72 – 74 % ее, в то время как для *Pichia* sp. 80-11 оптическая чистота продукта не зависит от концентрации субстрата.

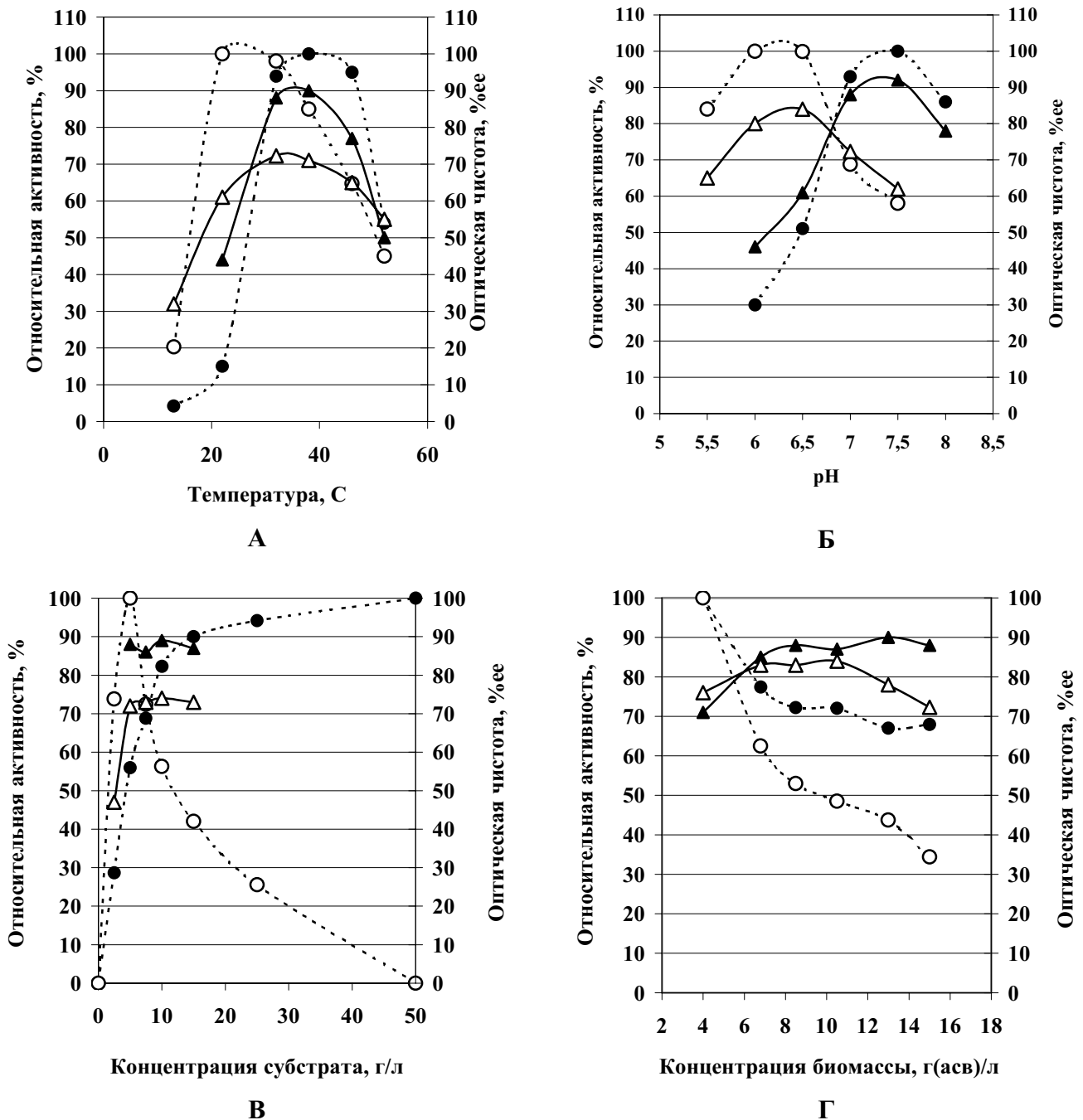
5.4. Зависимость от концентрации биомассы

При исследовании зависимости трансформации ЭАА от концентрации биомассы *Metschnikowia* sp. 84-13 (от 4 до 16 г (асв)/л) было обнаружено, что наиболее приемлемой является концентрация около 6 г(асв)/л. Использование более высоких концентраций биомассы приводит к значительному падению ее удельной активности, а применение более низких концентраций – к снижению качества продукта.

Биомасса *Pichia* sp. 80-11 может быть использована в более широком диапазоне концентраций (от 6 до 16 г(асв)/л), за исключением области низких концентраций, где начинается снижение оптической чистоты продукта трансформации.

5.5. Исследование зависимости трансформации ЭАА от вида атмосферы

Известно, что восстановление карбонилсодержащих соединений осуществляется с помощью ферментов, использующих в качестве восстановителя NADH или NADPH, содержание которых в клетке может снижаться в присутствии кислорода, например, вследствие окисления NADH при участии электронтранспортной цепи, использующей кислород в качестве акцептора электронов (Nakamura, 2001). Это позволило предположить, что восстановление ЭАА исследуемыми штаммами будет проходить более интенсивно в атмосфере азота, вследствие большей стабильности восстановленных форм коферментов в анаэробных условиях.



относительная активность штамма *Pichia* sp. 80-11

относительная активность штамма *Metschnikowia* sp. 84-13

Оптический выход S-ЭОБ (штамм *Pichia* sp. 80-11)

Оптический выход R-ЭОБ (штамм *Metschnikowia* sp. 84-13)

Рис. 2. Зависимость активности биомассы штаммов *Pichia* sp.80-11 и *Metschnikowia* sp. 84-13 и оптической чистоты S- и R-энантиомеров ЭОБ от параметров реакции *

А – температура, Б – pH, В – концентрация субстрата, Г – концентрация биомассы

* Условия реакции стандартные, за исключением исследуемого параметра, значение которого варьировалось в эксперименте

Однако, вопреки ожиданию, более высокая активность биомассы отмечалась в присутствии воздуха (табл. 5). Более того, через 3 ч наблюдалось замедление скорости реакции в атмосфере азота, в результате чего полная конверсия субстрата в этих условиях была достигнута только лишь через 24 - 48 ч, тогда как в присутствии воздуха – за 2 - 4 ч.

Замена воздушной атмосферы на азотную в случае штамма *Pichia* sp. 80-11 не привела к заметному изменению селективности восстановления ЭАА в S-ЭОБ, тогда как в случае штамма *Metschnikowia* sp. 84-13 имело место снижение оптической чистоты R-ЭОБ почти в 2 раза.

Таблица 5

Трансформация ЭАА и ЭОБ микроорганизмами в атмосфере азота и воздуха в стандартных условиях

Штамм	Субстрат	Условия реакции	Относительная активность, %	Конверсия, %	Время, ч	Продукт	Выход, %	Оптическая чистота, % ee
<i>Pichia</i> sp.80-11	ЭАА	Воздух	100	100	4	S-ЭОБ	99	88
		Азот	49	100	24	S-ЭОБ	100	90
		Азот + Na ₂ S ₂ O ₃	43	100	48	S-ЭОБ	100	89
<i>Metschnikowia</i> sp. 84-13	ЭАА	Воздух	100	96	2	R-ЭОБ	76	72,3
		Азот	11	100	24	R-ЭОБ	100	43,4
		Азот + Na ₂ S ₂ O ₃	5,5	100	50	S-ЭОБ	100	99
	ЭОБ	Воздух	-	20	10	ЭАА	10	-
		Азот	-	0	0	-	-	-

Интересно отметить, что введение в анаэробную реакционную смесь R-штамма *Metschnikowia* sp. 84-13 бисульфита натрия, еще более замедляет процесс трансформации ЭАА и приводит к образованию высокочистого S-энантиомера ЭОБ – антипода R-энантиомера, образуемого в отсутствие данной соли. В то же время в случае штамма *Pichia* sp.80-11 существенного влияния бисульфита натрия на восстановление ЭАА замечено не было.

В анаэробных условиях наблюдался количественный выход соответствующих энантиомеров ЭОБ как в случае штамма *Pichia* sp.80-11, так и в случае штамма *Metschnikowia* sp. 84-13, тогда как в аэробных условиях высокий выход продукта обеспечивается только штаммом *Pichia* sp.80-11. При трансформации ЭАА на воздухе штаммом *Metschnikowia* sp. 84-13, несмотря на 96 % конверсию субстрата, выход R-ЭОБ не превышает 76 %, что позволяет предполагать дальнейшее превращение продукта этим микроорганизмом.

Исследование трансформации экзогенного рацемического ЭОБ штаммом *Metschnikowia* sp. 84-13 показало, что действительно, в аэробных условиях имеет место снижение концентрации этого соединения, отсутствующее в анаэробных условиях (табл. 5). Однако в качестве продукта был обнаружен только ЭАА (продукт окисления оксиэфира), что говорит об обратимости исследуемых окислительно-восстановительных реакций.

5.6. Исследование кинетики аэробной трансформации ЭАА биомассой *Metschnikowia sp. 84-13*

В результате исследования аэробной трансформации ЭАА штаммом *Metschnikowia sp. 84-13* в течение 40 ч было обнаружено, что ограниченный на уровне 76 % выход R-ЭОБ увеличивается во времени до 97 % (рис. 3).

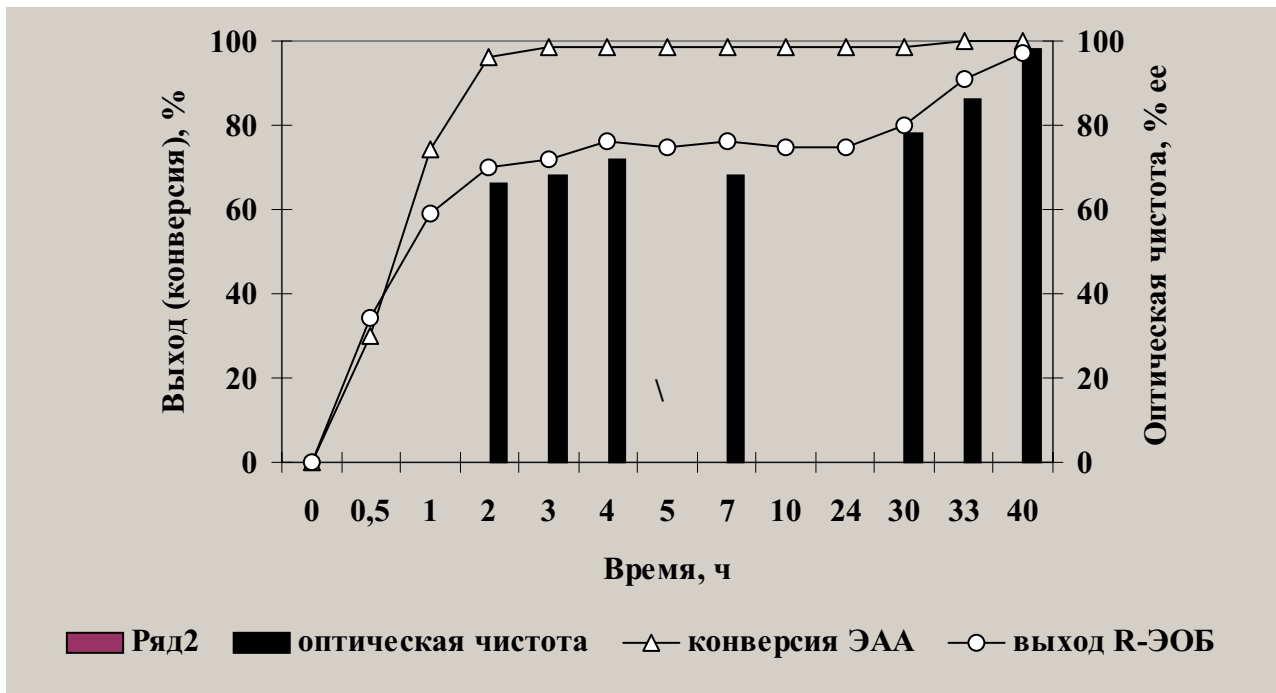
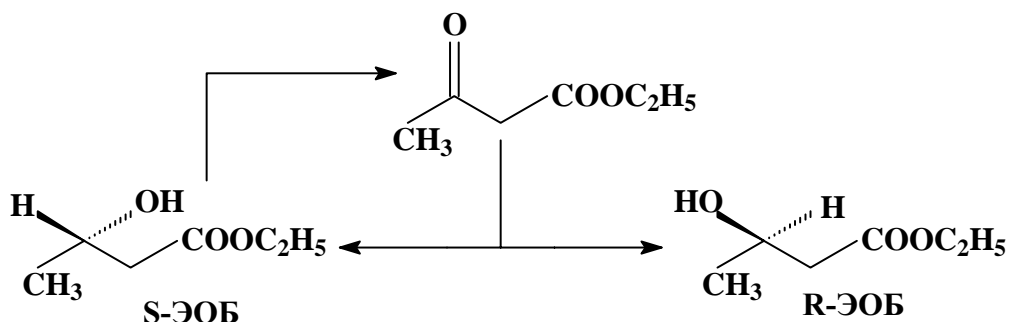


Рис. 3. Кинетика аэробной трансформации ЭАА штаммом *Metschnikowia sp. 84-13*

В результате исследования оптических свойств продуктов, полученных за различное время трансформации, было установлено, что восстановление ЭАА протекает с невысокой энантиоселективностью (в момент достижения практически полной конверсии получается продукт 72 % ee). Такая оптическая чистота продукта остается стабильной в течение нескольких часов, однако в конце трансформации она начинает расти (до 98 % ee). При этом отмечается корреляция между изменением энантиомерного состава ЭОБ и возрастанием выхода продукта в это же время.

Возможным объяснением обогащения реакционной смеси R-ЭОБ может служить стереоинверсия побочного S-ЭОБ в результате энантиоселективного окисления этого энантиомера на фоне низкоселективного восстановления ЭАА.



Можно предположить, что этот процесс протекает внутри клетки, поскольку в течение длительного времени имеет место низкий выход продукта почти при полной конверсии субстрата.

Таким образом, за счет увеличения времени трансформации ЭАА штаммом *Metschnikowia* sp. 84-13 можно получить высокочистый R-ЭОБ в аэробных условиях.

6. Влияние условий выращивания на трансформацию ЭАА

Известно, что не только условия применения биомассы в процессе трансформации, но и условия ее получения, а также ее возраст, имеют существенное значение для восстановления карбонилсодержащих соединений, поскольку от физиологического состояния микроорганизмов может зависеть как уровень ферментов, участвующих в трансформации, так и размер пула восстановленных коферментов в клетке (Dahl, 1998; Faber, 1999).

6.1. Зависимость восстановления ЭАА от возраста биомассы

Было установлено, что скорость восстановления ЭАА исследуемыми штаммами и оптическая чистота, образующихся при этом продуктов меняются в процессе роста биомассы (рис. 4).

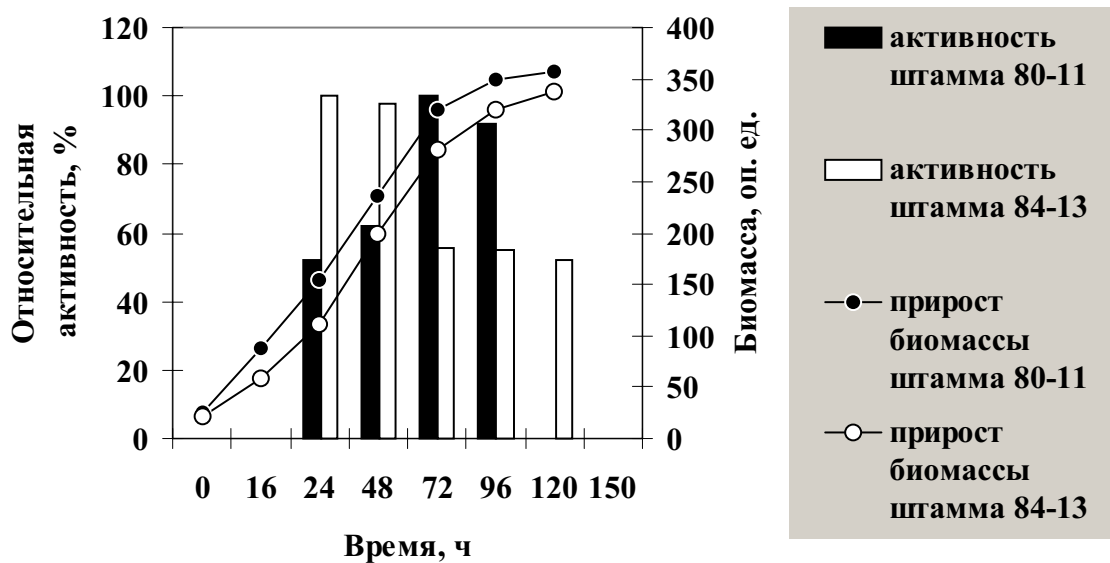


Рис. 4. Динамика роста и карбонилредуктазной активности биомассы микроорганизмов при трансформации в стандартных условиях

Карбонилредуктазная активность штамма *Metschnikowia* sp. 84-13 имеет наибольшее значение в логарифмической фазе роста (1 – 2 суток) и начинает снижаться к 3 суткам в период замедления роста (рис. 4). Напротив, активность штамма *Pichia* sp.80-11 в фазе замедления роста (3 суток) только достигает максимального уровня.

Зависимости оптической чистоты образующихся продуктов от возраста биомассы исследуемых штаммов имеют экстремальный характер (рис. 5).

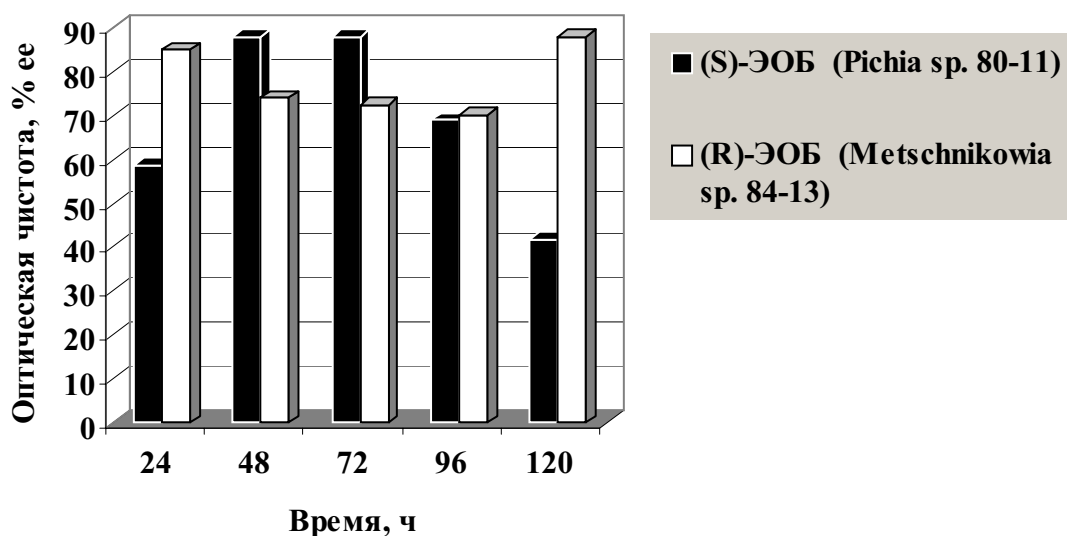


Рис.5. Зависимость оптической чистоты продуктов восстановления ЭАА от возраста биомассы микроорганизмов при трансформации в стандартных условиях

Наиболее чистый R-ЭОБ может быть получен при использовании одно-, двух- или пятисуточной культуры *Metschnikowia sp. 84-13*. Для получения высокочистого S-ЭОБ необходимо использовать биомассу *Pichia sp.80-11* двух – трехсуточного возраста.

6.2. Трансформация ЭАА биомассой *Pichia sp. 80-11*, выращенной в анаэробных условиях

В результате исследования роста исследуемых дрожжей и продуктов их метаболизма, накапливающихся в среде с сахарозой, в анаэробных условиях было установлено, что *Pichia sp.80-11* способен расти при ограничении доступа воздуха, осуществляя спиртовое брожение.

Использование трехсуточной биомассы *Pichia sp.80-11*, выращенной в таких условиях, для трансформации ЭАА в атмосфере азота позволило получить за 50 ч высокочистый S-ЭОБ практически с количественным выходом (табл. 6).

Таблица 6

Трансформация ЭАА в атмосфере азота и воздуха биомассой *Pichia sp.80-11*, выращенной в анаэробных условиях

Условия реакции	Конверсия, %	Время, ч	Продукт	Выход, %	Оптическая чистота, % ee
Воздух	100	48	S-ЭОБ	98	99
Азот	100	50	S-ЭОБ	98	98

Более того, было установлено, что такая биомасса обеспечивает синтез S-ЭОБ практически с теми же показателями и в воздушной атмосфере, отличающимися от показателей биомассы, выращенной в аэробных условиях (табл. 5 и 6). Это позволяет предполагать, что в анаэробно выращенных клетках *Pichia sp.80-11* отсутствует активная восстановительная система R-типа.

6.3. Восстановление ЭАА биомассой *Pichia sp.80-11*, выращенной на этаноле

Восстановление ЭАА анаэробно выращенной биомассой *Pichia sp.80-11* позволяет получить S-ЭОБ высокого качества, но занимает довольно много времени, в связи с чем была предпринята дополнительная попытка улучшить селективность аэробной трансформации кетоэфира биомассой, выращенной в присутствии воздуха, путем подбора условий, обеспечивающих избирательное усиление вклада карбонилредуктазной системы S-типа в этот процесс.

Учитывая способность *Pichia sp. 80-11* осуществлять спиртовое брожение, было предположено, что, как и в случае пекарских дрожжей, в восстановлении ЭАА основную роль может играть S-специфичная алкогольдегидрогеназа (Stewart, 2000). Установлено, что алкогольдегидрогеназа функционирует у штамма *Pichia sp.80-11* и в аэробных условиях, поскольку при росте на среде с высоким содержанием сахарозы (более 1 %) этот микроорганизм осуществляет брожение с временным накоплением в среде этанола, который затем ассимилируется в процессе дыхания (эффект Крэбтри).

В результате пассирования на средах с высокими концентрациями этанола (3 - 7 %) была получена биомасса, обладающая карбонилредуктазной активностью (стандартные условия), в 3,7 раза превышающей активность трехсуточной биомассы, выращенной на среде с сахарозой. При этом наблюдалось небольшое увеличение оптической чистоты продукта до 92 % ее.

7. Исследование возможности повторного использования биомассы для восстановления ЭАА

С целью интенсификации процессов энантиоселективного восстановления ЭАА найденными микроорганизмами была оценена возможность многократного использования их биомассы для получения оптически активных продуктов.

В результате исследования работы биомассы микроорганизмов в стандартных условиях в течение нескольких циклов было обнаружено, что ее карбонилредуктазная активность снижается более чем на 50 % в случае *Pichia sp.80-11* после 3 цикла, а в случае штамма *Metschnikowia sp. 84-13* – после 4 цикла трансформации (рис. 6). В случае штамма *Pichia sp.80-11* имеет место увеличение активности биомассы после 1 цикла.

Оптическая чистота S-ЭОБ, синтезируемого штаммом *Pichia sp.80-11*, несколько увеличивается после 1 цикла, но начинает падать после 2 цикла, в то же время оптическая чистота R-ЭОБ не изменяющаяся в течение первых 4 циклов, начинает возрастать к 7 циклу.

Получены данные, указывающие на то, что увеличение активности биомассы штамма *Pichia sp.80-11*, наблюдаемое во втором цикле трансформации, коррелирующее с возрастанием оптической чистоты (S)-ЭОБ, напрямую не связано с процессом восстановления ЭАА. Подобный эффект обнаруживается и после предварительного выдерживания биомассы в стандартных условиях реакции, но без внесения ЭАА (рис. 7).

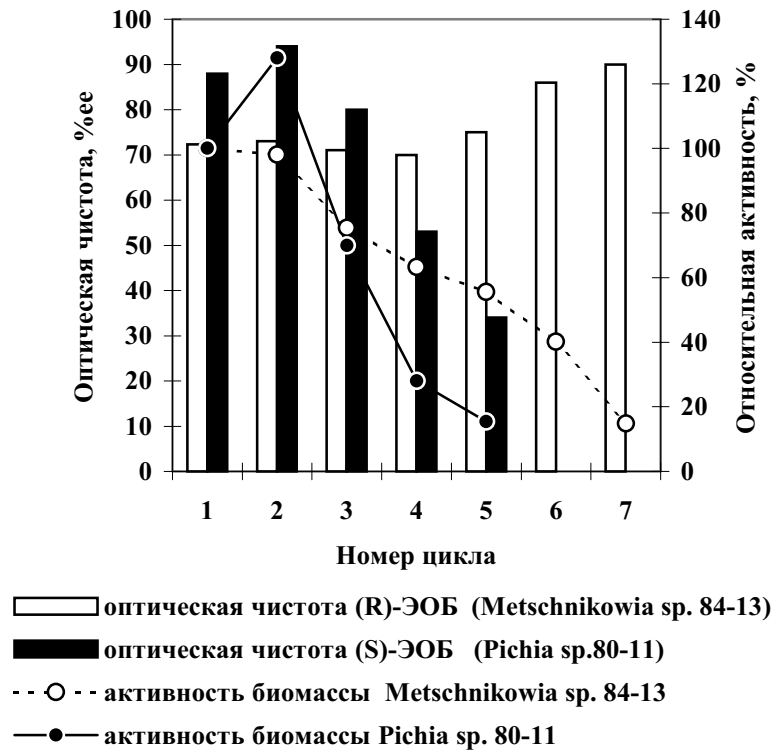


Рис. 6. Изменение активности биомассы и оптической чистоты продуктов при циклической трансформации ЭАА

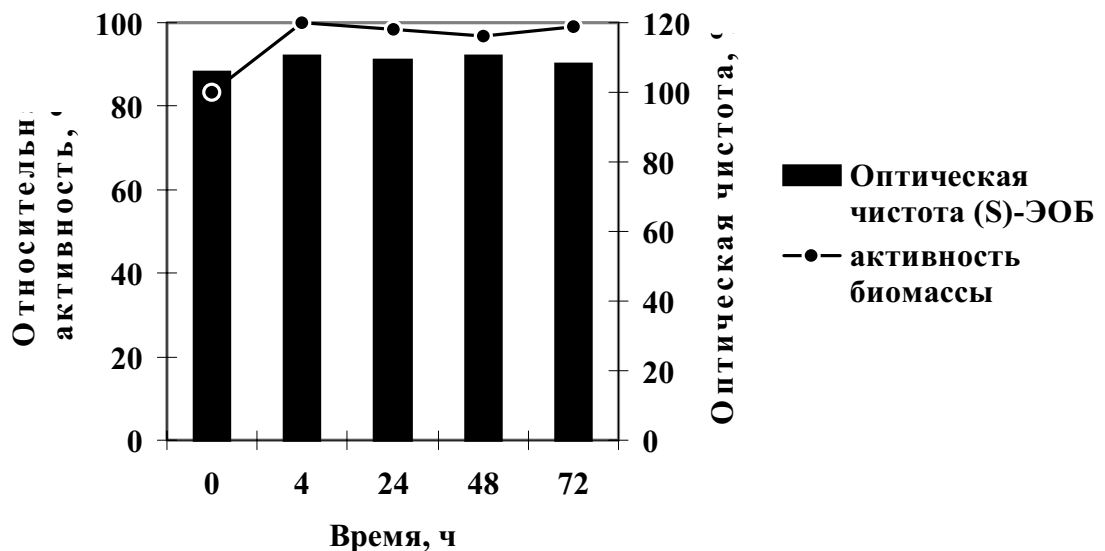


Рис. 7. Зависимость селективных свойств и активности биомассы *Pichia sp.80-11* от времени прединкубации

Это позволяет рассматривать прединкубацию биомассы как подход к повышению скорости и селективности восстановления ЭАА штаммом *Pichia sp.80-11*. Установлено, что положительный эффект этой операции может быть достигнут в течение 4 ч.

Кроме того, представленные на рис. 7 данные свидетельствуют о высокой стабильности карбонилредуктазной активности и селективности биомассы штамма *Pichia sp.80-11* в отсутствие ЭАА в течение 72 ч (рис. 7). Это позволяет предполагать, что наблюдаемое на рисунке 6 ухудшение каталитических и энантиоселективных свойств биомассы при использовании в течение 5 циклов трансформации ЭАА (суммарное время около 20 ч), скорее всего, связано с истощением клеточных запасов восстановленных коферментов NAD(P)H, используемых в процессе восстановления в субстратных количествах.

8. Поиск экзогенных восстановителей для регенерации отработанной биомассы

В случае применения цельноклеточных катализаторов наиболее доступным способом регенерации восстановленных форм коферментов является использование экзогенных соединений, окисляющихся под действием NAD(P)⁺-зависимых дегидрогеназ, имеющих в клетках (Matsuda, 2002). В связи с этим была предпринята попытка регенерации активности отработанной биомассы путем ее инкубирования в присутствии экзогенных восстановителей (этанола, лактата и сахарозы).

В результате исследования было установлено, что ни одно из исследуемых соединений не восстанавливало карбонилредуктазную активность биомассы штамма *Metschnikowia sp. 84-13*. Вместе с тем было обнаружено, что выдерживание истощенной биомассы штамма *Pichia sp.80-11* в течение 4 ч в 0,05 % растворе этанола не только восстанавливало способность клеток трансформировать ЭАА, но усиливало их активность по сравнению с исходной почти в 1,6 раза (рис. 8).

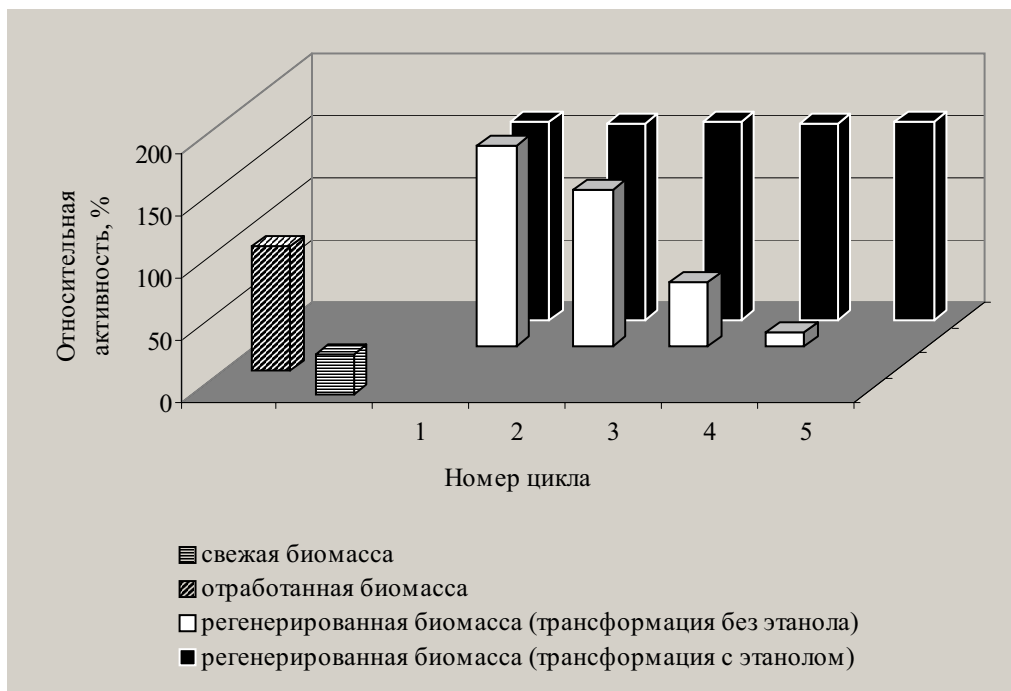


Рис. 8. Трансформация ЭАА регенерированной биомассой *Pichia sp.80-11*

Однако такая регенерированная биомасса сохраняла свою повышенную активность в течение одного цикла, после чего она начинала падать.

Было установлено, что для стабилизации активности биомассы предпочтительнее вводить этанол непосредственно в реакционную смесь одновременно с ЭАА. В его присутствии регенерированная биомасса сохраняла активность, по крайней мере, в течение 5 циклов трансформации (рис. 8).

В опытах со свежей биомассой было показано, что этанол можно вводить до концентрации 10 г/л без подавления карбонилредуктазной активности (рис. 9). Использование более высоких концентраций спирта приводит к ее снижению.

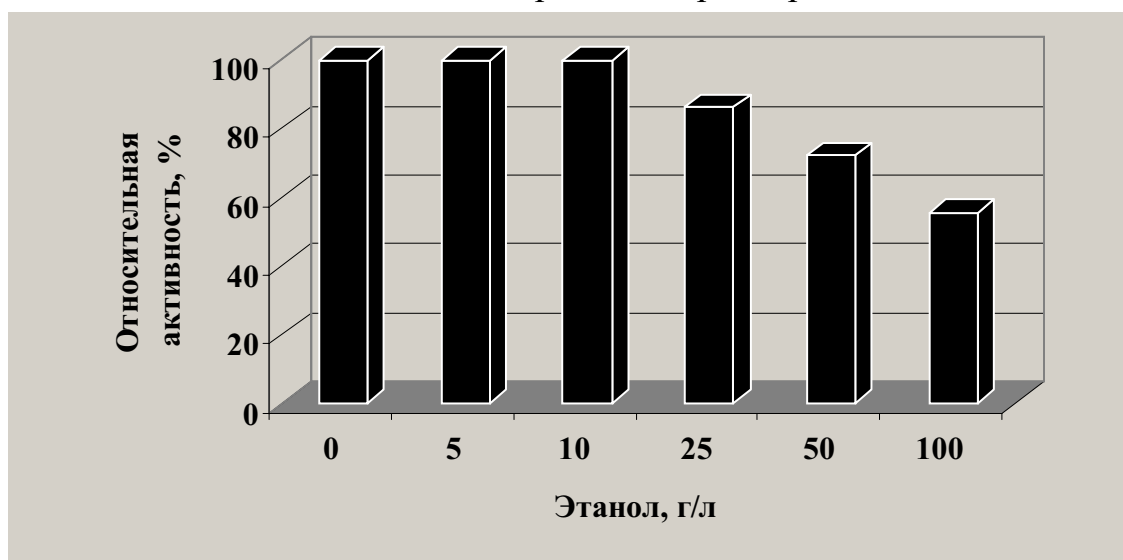


Рис. 9. Влияние этанола на трансформацию ЭАА *Pichia sp.80-11*

Показано, что биомасса, регенрированная таким способом обеспечивает синтез S-ЭОБ не менее 94 %ее в стандартных условиях.

9. Разработка иммобилизованного биокатализатора на основе клеток *Pichia sp. 80-11*

Возможность длительного использования биомассы дрожжей *Pichia sp. 80-11* обусловила целесообразность разработки иммобилизованного биокатализатора, применение которого значительно упрощает процесс его рециклизации и выделение продукта. В связи с этим была осуществлена иммобилизация клеток включением в полиакриламидный гель. В результате исследования работы такого биокатализатора была установлена его высокая активность, стабильность и способность регенерироваться этанолом.

10. Разработка препаративных методов получения S- и R-энантиомеров ЭОБ

С целью получения препаративных количеств S и R-энантиомеров ЭОБ была разработана схема получения этих соединений с помощью иммобилизованных клеток *Pichia sp. 80-11* и свободных клеток *Metschnikowia sp. 84-13*.

При реализации этой схемы с применением лабораторного оборудования на основе биомассы *Pichia sp. 80-11* был получен полиакриламидный биокатализатор, позволяющий за один цикл трансформации в подобранных для этого штамма

условиях (рН = 7,5; субстрат – 5 г/л; температура реакции 32 °С, время реакции – 4 ч) получить 4,5 г S-ЭОБ не менее 98% ee.

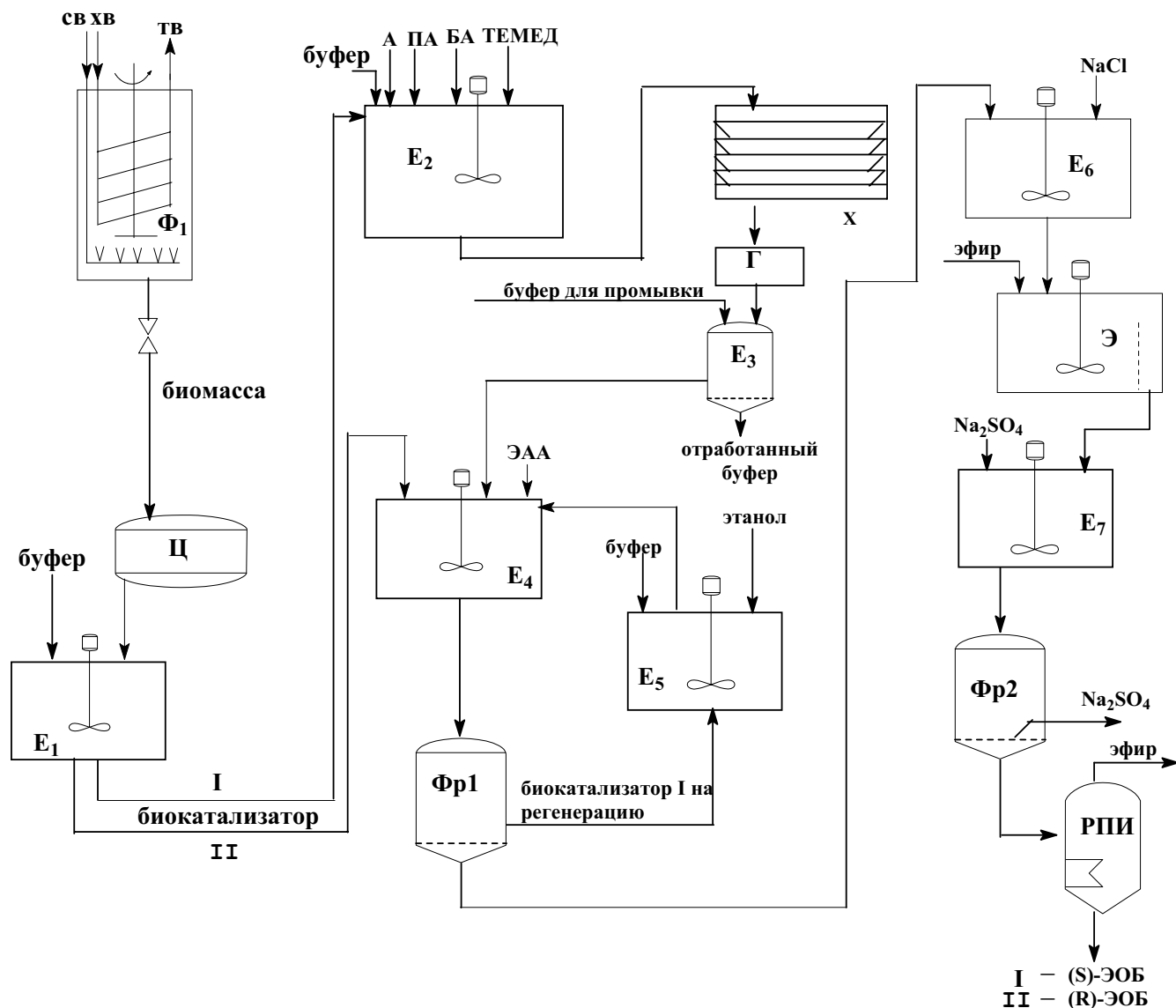


Рис. 12. Принципиальная схема синтеза S-ЭОБ иммобилизованным биокатализатором *Pichia* sp. 80–11 и R-ЭОБ биокатализатором *Metschnikowia* sp. 84-13

I - биокатализатор *Pichia* sp. 80–11

II - биокатализатор *Metschnikowia* sp. 84-13

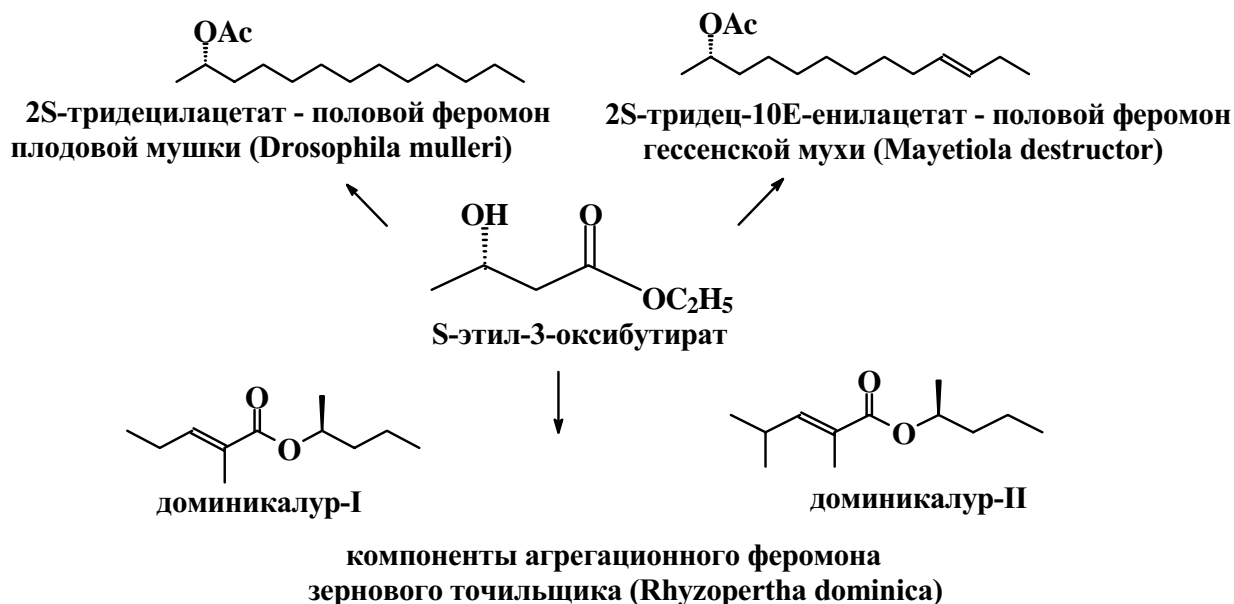
А-акриламид, БА-бисакриламид, ПА-персульфат аммония, ТЕМЕД-NNN'N'-тетраметилендиамин, св – стерильный воздух, хв – холодная вода, тв – теплая вода

Φ1- ферментер, Ц-центрифуга, E1-7 - емкости, X-холодильник, Г - гранулятор, Φp1,Φp2 - фильтры, Э - экстрактор, РПИ - роторно-пленочный испаритель.

С помощью незакрепленных клеток дрожжей *Metschnikowia* sp. 84-13 в найденных оптимальных условиях трансформации (рН = 6,5; субстрат – 5 г/л; биомасса – 8,5 г(асв)/л; аэробные условия, температура реакции 32 °С, время реакции – 40 ч), был осуществлен синтез (R)-ЭОБ оптической чистотой 98 % ee.

11. Использование S-энантиомера ЭОБ в синтезе феромонов насекомых

Образцы S-ЭОБ были переданы в ИОХ УНЦ РАН, где в лаборатории низкомолекулярных биорегуляторов насекомых (заведующий лабораторией - д.х.н. Ишмуратов Г.Ю.) были осуществлены энантиоселективные синтезы феромонов насекомых – вредителей сельскохозяйственных растений.



Были получены 2S-тридецилацетат (*ee* ~ 97%) – половой феромон плодовой мушки (*Drosophila mulleri*, *Drosophila buscki*), 2S-тридец-10E-енилацетат - половой феромон гессенской мухи (*Mayetiola destructor*), наносящих большой ущерб посевам озимых и яровых пшениц и S-1-метилбутиловые эфиры 2-метил- и 2,4-диметилпент-2E-еновых кислот, известные под названием доминикалур-I (I) и доминикалур-II (II) соответственно, которые входят в состав агрегационного феромона зернового точильщика (*Rhyzopertha dominica*) - вредителя зерновых запасов.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга из природных источников выделены и идентифицированы микроорганизмы *Pichia* sp. 80-11, *Candida* sp. 81-12 и *Metschnikowia* sp. 84-13, обладающие высокой карбонилредуктазной активностью.

2. На основе штаммов *Pichia* sp. 80-11 и *Metschnikowia* sp. 84-13 разработаны энантиоселективные биокатализаторы, способные осуществлять энантиоселективное восстановление этилацетоацетата с количественным выходом S- и R-энантиомеров этил-3-оксипропанойата высокой оптической чистоты.

3. Установлено влияние параметров роста биомассы (времени культивирования, аэробных и анаэробных условий, различных источников углерода) и трансформации на активность и селективность биокатализаторов.

4. Найдены условия, позволяющие количественно получать S-этил-3-оксипропанойат с чистотой не менее 98 %*ee*. Показано, что энантиомер образуется при условиях реакции: температура – 32 °C; pH буфера – 7,5; концентрация субстрата - 5 г/л; концентрация клеток – 8,5 г(асв)/л при использовании биомассы *Pichia* sp. 80-11, выращенной в анаэробных условиях, в течение 50 ч или биомассы, полученной в аэробных условиях, в течение 4 ч.

5. Выявлены условия, позволяющие количественно получать R-этил-3-оксибутират с чистотой не менее 98 %ее. Показано, что энантиомер образуется при использовании штамма *Metschnikowia* sp. 84-13 в логарифмической фазе роста и параметрах реакции: температура – 32 °С; рН буфера – 6,5; концентрация субстрата – 5 г/л; концентрация клеток – 8,5 г(асв)/л, время реакции 40 часов.

6. Показана возможность многократного применения созданных биокатализаторов в течение длительного времени, а также возможность регенерации биокатализатора на основе штамма *Pichia* sp. 80-11 легкодоступным экзогенным восстановителем – этанолом.

7. Путем иммобилизации клеток штамма *Pichia* sp. 80-11 в полиакриламидный гель создан биокатализатор многократного использования для энантиоселективного восстановления этилацетоацетата в S-этил-3-оксибутират.

8. На основе проведенных исследований научно обоснована принципиальная технологическая схема получения S-этил-3-оксибутирата и R-этил-3-оксибутирата - синтонов низкомолекулярных биорегуляторов с использованием разработанных биокатализаторов на основе штаммов *Pichia* sp. 80-11 и *Metschnikowia* sp. 84-13.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Н.И. Петухова, А.Р. Давлетова, И.В. Привалова, В.В. Зорин. Стереоселективное восстановление этилацетоацетата микроорганизмами. Башкирский химический журнал-1998, т.5, №3.-С. 42-45.
2. N.I. Petukhova, A.D.Zinnurova, A.R. Davletova, V.V. Zorin. Stereoselective Reduction of Ketones with Resting Cells of New Strains of Microorganisms//8th Meeting on Stereochemistry, Praga, 1998, p. 24.
3. Давлетова А.Р. Файфер Л. Зорин В.В. Стереоселективный синтез синтонов биологически активных веществ биовосстановлением карбонилсодержащих соединений. //Заочно научно-практич. конф. "Биотехнология ФЦП "Интеграция"", Санкт – Петербург, 28-30.сентября 1999 г., с 50-51
4. Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Новые штаммы для получения R-этилоксибутирата путем стереоселективного восстановления. II межд. конф. молодых ученых "Актуальные тенденции в органическом синтезе на пороге новой эры", г. Санкт – Петербург, 28-30 сентября 99 г, с. 42.
5. Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование кинетики восстановления этилацетоацетата почвенными микроорганизмами. // “Проблемы нефтегазового комплекса России”, // Тез. Докладов межд. научно-технической конференции, посвященной 50-летию УГНТУ, Уфа, 13-15 мая, 1998, с 46.
6. Давлетова А.Р., Привалова И.В., Сорокоумова Е.В., Петухова Н.И. Микробиологическое восстановление метилвторбутилкетона.// Материалы 49-й научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященная 50-летию УГНТУ, 1998, с 36
7. Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Васильева В.В., Зорин В.В. Поиск штаммов, способных к биотрансформации рацемических циклопентановых блоков. "Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии"// Тез. докл. XII междун. конф. по производству и применению химических реагентов "Реактив-99", Москва, 7-8 сентября 1999, с. 69.
8. Васильева В.В., Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Влияние концентрации этилацетоацетата на восстановление (R)-этилоксибутирата почвенными микроорганизмами.// Тезисы докладов 50-й научно-технической конференции студентов, аспиран-

тов и молодых ученых УГНТУ по секции «Технология переработки углеводородного сырья» по подсекции «Биотехнология», Уфа, 1999 г, с 53

9. Васильева В.В., Давлетова А.Р., Петухова Н.И. Микробиологическое стереоселективное восстановление этиацетоацетата при многократном использовании биомассы. // Тезисы докладов 50-й научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых УГНТУ, 1999 г, с 92.

10. Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование условий энантиоселективного восстановления этилацетоацетата почвенными микроорганизмами. "Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии" // Тез. докл. XII междунар. конф. по производству и применению химических реагентов "Реактив-99", Москва, 7-8 сентября 1999, с. 68.

11. Давлетова А.Р., Васильева В.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Влияние концентрации этилацетоацетата на восстановление (R)-этилоксибутирата почвенными микроорганизмами. Междунар. Научно-практическая конф. "Сервис большого города", посвященная 425-летию Уфы, УТИС, г. Уфа, 20-21 мая 1999 г, Уфа, с. 53.

12. Р.Я.Харисов, М.П.Яковлева, А.Р.Давлетова, Н.И.Петухова, Г.Ю.Ишмуратов, В.В.Зорин Стереоконтролируемый синтез ацетатов 2S-аоканолов- феромонных компонентов *Drosophila mulleri*, *D.buscki* и *Mayetiola destructor* // Тезисы научной конференции, посвященной 150-летию академика Павлова (секция «Биотехнология, микробиология, экология, органический синтез и медицина»), Уфа 1999-с 56.

13. Файфер Л.В., Давлетова А.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование влияния этанола на стереоселективный синтез этил-3-оксибутирата штаммом 80-11. // Материалы 51-й научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых УГНТУ, 2000, с. 44.

14. А.Р.Давлетова, Л.В.Файфер, Н.И.Петухова, В.В.Зорин Способ регенерации биокатализатора в реакциях микробиологического восстановления. // Тез. докл. XIII междунар. конф. по производству и применению химических реагентов "Реактив-2000", Тула, с – 189

15. А.Р.Давлетова, Н.И.Петухова, В.В.Зорин. Стереоселективный синтез (S)-этилоксибутирата дрожжевым штаммом 80-11. Уфа, С - 57// Тез. докл. XIV междунар. конф. «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» "Реактив-2001"

16. Л.В.Файфер, А.Р. Давлетова. Исследование влияния условий трансформации на энантиоселективный синтез (S)-этилоксибутирата дрожжевым штаммом 80-11// Тезисы XXXIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» секция химия, Новосибирск, 2001 г. – с 63.

17. Р.Я.Харисов, Н.И. Петухова, Л.В.Файфер, А.Р. Давлетова, В.В. Зорин., Г.Ю.Ишмуратов, Г.А.Толстикова. Стереоконтролируемый синтез доминикалура I и доминикалура-II – компонентов феромона зернового точильщика. Башкирский химический журнал-1998, т.7, №5.-С. 46-48.

18. Р.Я.Харисов, Н.И. Петухова, А.Р. Давлетова, Н.М.Ишмуратова, В.В. Зорин., Г.Ю.Ишмуратов, Г.А.Толстикова. Стереоконтролируемый синтез половых феромонов *Drosophila mulleri* и *Mayetiola destructor*. Химия природных соединений, Академия наук республики Узбекистан – 2000, №2 – С. 167-169.

19. А.Р.Ибрагимова, Н.И.Петухова, В.В.Зорин. Влияние условий культивирования дрожжей *Pichia* sp. 80-11 на селективность восстановления этилацетоацетата. Материалы всероссийской заочной конференции «Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях», Тверь, 2002 г. – с 38.