

На правах рукописи

КОНОВАЛОВ АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ РАЗДЕЛЕНИЯ РАЦЕМИЧЕСКИХ
ЭФИРОВ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОЛАЗ МИКРООРГАНИЗМОВ**

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
Мелентьев Александр Иванович;

кандидат технических наук
Терехова Елена Яковлевна.

Ведущая организация Башкирский государственный университет.

Защита состоится 25 декабря 2002 года в 10⁰⁰ 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 "25" ноября 2002 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самойлов Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время поиск новых высокоэффективных лекарственных средств, обладающих направленным действием и пониженной токсичностью, а также биологически активных веществ, используемых для создания экологически чистых методов защиты растений осуществляется среди природных соединений и их модифицированных или синтетических аналогов. Многие из них имеют специфическую стереохимию, обусловленную наличием двойных связей или хиральных центров. Для создания методов получения синтетических аналогов природных соединений необходимы оптически активные блоки. Значительный интерес в качестве таких блоков представляют оптически активные спирты, оксикарбоновые кислоты и их эфиры.

Стереонаправленный синтез или разделение оптических изомеров химическими методами представляет собой сложную и дорогостоящую задачу, вследствие чего особенно перспективным является микробиологический подход, основанный на стереонаправленной биотрансформации органических соединений. В ряду ферментативно катализируемых реакций особый интерес представляет энантиоселективный гидролиз рацемических эфиров, катализируемый липолитическими микроорганизмами, так как липазы являются коферментнезависимыми, проявляют широкую субстратную специфичность, высокую стереоселективность и стабильность. Кроме того, особенностью липаз, является их способность катализировать реакции этерификации и трансэтерификации в органических растворителях, которые широко используются при получении оптически активных соединений. В связи с этим поиск новых эффективных микроорганизмов, содержащих стереоспецифичные гидролазы с целью создания на их основе биокатализаторов для энантиоселективного синтеза оптически активных спиртов, оксикислот и их эфиров является актуальной задачей.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с заданием Министерства образования РФ по тематическому плану НИР Уфимского государственного нефтяного технического университета (УГНТУ): Федеральной целевой программой «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки» (1997-2001 гг.); научно-технической программой «Научные исследования Высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники» 1998-2002 гг.

Цель работы Разработка новых высокоэффективных биокатализаторов гидролиза рацемических эфиров на основе микроорганизмов, обладающих гидролазной активностью, и создание методов получения оптически активных спиртов, эфиров и оксикислот.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- скрининг микроорганизмов и внеклеточных ферментов, обладающих высокой гидролазной активностью и способных осуществлять энантиоселективный гидролиз рацемических эфиров вторичных спиртов и оксикислот;
- исследование морфологических, физиолого-биохимических и патогенных свойств найденных микроорганизмов;
- разработка энантиоселективных биокатализаторов парциального гидролиза эфиров на основе клеток микроорганизмов;

- модификация биокатализаторов с целью увеличения их стабильности, активности и срока хранения;
- поиск оптимальных условий роста биомассы и работы биокатализаторов при гидролизе эфиров;
- исследование возможности использования найденных биокатализаторов для энантиоселективного ацидолиза, алкоголиза и аммонолиза в органическом растворителе;
- разработка методов разделения рацемических эфиров в водной и органической средах с помощью созданных биокатализаторов.

Научная новизна. Найденны и идентифицированы 3 новых непатогенных штамма: *Bacillus* sp. 77-1, *Bacillus* sp. 79-54 и *Rhodococcus* sp. 78-5, на основе которых созданы стереоселективные биокатализаторы, эффективно катализирующие как гидролиз эфиров рацемических спиртов и оксикислот в водной среде, так и алкоголиз, ацидолиз и аммонолиз этих соединений в органической фазе. Разработаны научно обоснованные методы синтеза оптически активных спиртов, оксикислот и их эфиров с использованием созданных биокатализаторов. Найденны условия, в которых биокатализаторы проявляют наивысшую активность. Доказана высокая стабильность и возможность многократного использования разработанных биокатализаторов.

Практическая значимость. Разработаны новые высокоэффективные биокатализаторы на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1, *Bacillus* sp. 79-54, *Rhodococcus* sp. 78-5 энантиоселективно катализирующие как гидролиз эфиров рацемических спиртов и оксикислот в водной среде, так и алкоголиз, ацидолиз и аммонолиз этих соединений в органической фазе. Созданы препаративные методы получения (S)-(+)-втор-бутанола, (R)-(-)-втор-бутилацетата, (S)-(+)-этил-3-оксибутирата, (R)-(-)-этил-3-оксибутирата, (S)-(+)-3-оксимасляной кислоты, (R)-(-)-3-оксимасляной кислоты, (S)-(+)- глицидола и (R)-(-)-глицидола высокой оптической чистоты (96 – 100 %ee), которые являются ценными синтонами при получении различных низкомолекулярных биорегуляторов (феромонов насекомых, β -адренергетиков, церебронидов, гормонов, простагландинов, нуклеозидов,) и биоразлагаемых полимеров. Методика разделения рацемических втор-бутилацетата, этил-3-оксибутирата и глицидилового эфира метакриловой кислоты используется в учебном процессе УГНТУ при подготовке инженеров по специальности 07.01.00 – «Биотехнология».

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на II Международной конференции «Актуальные тенденции в синтезе на пороге новой эры» (Санкт-Петербург, июнь 1999); V Международной конференции по интенсификации нефтехимических процессов «Нефтехимия-99» (Нижнекамск, сентябрь 1999); XXXVII Международной Научной студенческой конференции (Новосибирск, апрель 1999); 49 научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Уфа, апрель 1999); Международной научно-практической конференции «Сервис большого города» (Уфа, май 1999); XII Международной конференции по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-99», (Уфа-Москва, сентябрь 1999); Республиканской научной конференции «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины», (Уфа, октябрь 1999);

Заочно научно-практической конференции "Биотехнология ФЦП "Интеграция", (Санкт – Петербург, июнь 1999); XXXVIII Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2000); XIII Международной конференции по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-2000», (Уфа-Москва, 2000); XXXIX Международной научной студенческой конференции, (Новосибирск, 2001); 51 научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. (Уфа, 2001).

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

Структура и объём работы. Диссертация включает введение, обзор литературы (глава 1), описание объектов и методов исследования (глава 2), обсуждение результатов (глава 3), выводы и список цитируемой литературы, содержащий 135 наименований. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста и содержит 35 рисунков и 32 таблицы.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Изучение литературных источников показало, что стереонаправленная биотрансформация органических соединений липазами является одной из наиболее перспективных и интенсивно разрабатываемых областей современной биотехнологии в США, Японии и странах Западной Европы. Однако, количество ферментных препаратов и, особенно, биокатализаторов на основе интактных клеток микроорганизмов, позволяющих получать соединения высокой оптической чистоты (95-100% ee) невелико и они не универсальны. Вследствие этого существует необходимость поиска новых липолитических микроорганизмов, способных катализировать энантиоселективный гидролиз рацемических эфиров, а также создания новых методов получения оптически активных веществ на их основе.

2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами биотрансформации являлись липолитические микроорганизмы синтезирующие внеклеточные или внутриклеточные липазы, выделенные из почвенных образцов, взятых с различных участков химических производств Республики Башкортостан и Сибири, а также втор-бутилацетат, этил-3-оксибутират, глицидиловый эфир метакриловой кислоты и N-3E-пентен-2-ил-ортотолуидин ацетамид. При проведении исследований использовались биохимические методы исследований, а также современные физико-химические методы анализа – ЯМР (^{13}C , ^1H), хроматомасс-спектрометрия.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Скрининг липолитических микроорганизмов – потенциальных источников энантиоселективных ферментов

Поиск биокатализаторов, способных энантиоселективно осуществлять гидролиз рацемических эфиров спиртов и оксикислот производился в соответствии со схемой представленной на рисунке 1.

Из накопительных культур, полученных на жидкой среде СР-1 с оливковым маслом в качестве единственного источника углерода и энергии, были

выделены 145 бактериальных штаммов, которые на агаризованной среде с родамином 6G в процессе роста накапливали жирные кислоты образующие окрашенный комплекс с красителем. При работе с чистыми культурами этих микроорганизмов были обнаружены 29 штаммов, образующих внеклеточные белки в процессе роста на жидкой среде CP-1.

В результате исследования гидролиза оливкового масла препаратами внеклеточных белков этих микроорганизмов была выявлена липолитическая активность у 5 ферментных препаратов. Кроме того, была обнаружена липолитическая активность клеток у всех 145 штаммов.



Рис. 1. Схема скрининга микроорганизмов – потенциальных источников энантиоселективных гидролаз:

Стандартные условия гидролиза: среда - 0,05 М фосфатный буфер pH = 7,0; время реакции - 5 ч.; начальная концентрация субстрата - 5 г/л; температура - 30 °С. В случае гидролиза втор-бутилацетата для повышения растворимости в реакцию вводился ацетон 20 % об.

Исследование способности найденных ферментных препаратов и клеток микроорганизмов трансформировать рацемический втор-бутилацетат и этил-3-оксибутират в течение 5 часов позволило отобрать штаммы, гидролизующие эти соединения с конверсией близкой к 50% уровню (14 и 11 штаммов, соответственно), что соответствует теоретически возможному выходу в процессах кинетического разделения рацемических смесей органических соединений.

3.1.1. Исследование трансформации втор-бутилацетата

Изучение кинетики гидролиза втор-бутилацетата найденными микроорганизмами в течение 10 часов показало, что 10 штаммов сохранили достигнутый к 5 часам уровень конверсии, тогда как 4 штамма продолжают конвертировать субстрат дальше.

Установлено, что причиной остановки конверсии субстрата на 50 % уровне не связано с ингибированием активности клеток, поскольку введение второй порции субстрата приводит к его трансформации с той же скоростью и до того же уровня превращения, что и в I цикле. Более вероятной причиной неполного превращения втор-бутилацетата является стереоселективный гидролиз ферментами микроорганизмов одного из энантиомеров рацемической смеси, тогда как второй энантиомер не подвергается трансформации.

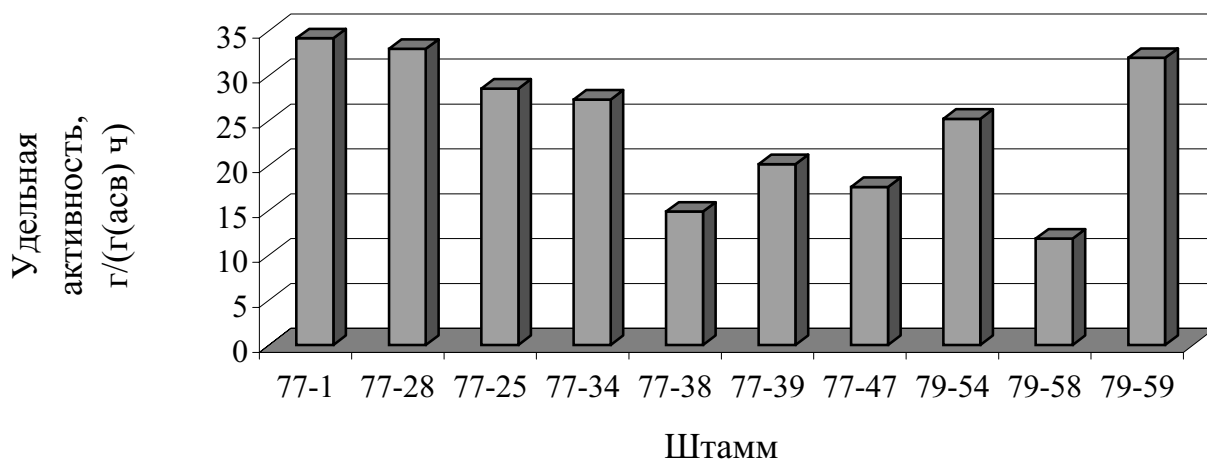
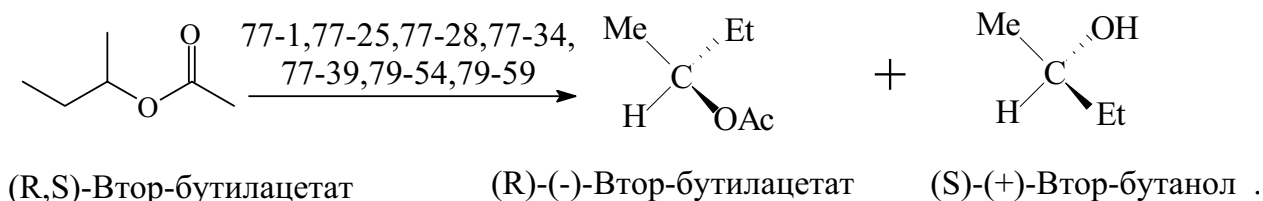


Рис. 2. Удельная активность микроорганизмов, катализирующих гидролиз втор-бутилацетата

Условия реакции: pH= 7,0; t=30 °C; время 5 ч; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Изучение оптических свойств продуктов реакции для 7 наиболее активных штаммов катализирующих гидролиз втор-бутилацетата со скоростью свыше 25 г/г(асв)•ч (рис. 2): 77-1, 77-25, 77-28, 77-34, 77-39, 79-54, и 79-59 подтвердило результаты кинетических исследований. Было обнаружено, что все 7 штаммов энантиоселективно гидролизуют (S)-изомер (R,S)-втор-бутилацетата (табл. 1).



Выход и оптическая чистота продуктов трансформации

Условия реакции: pH= 7,0; t=30 °С; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

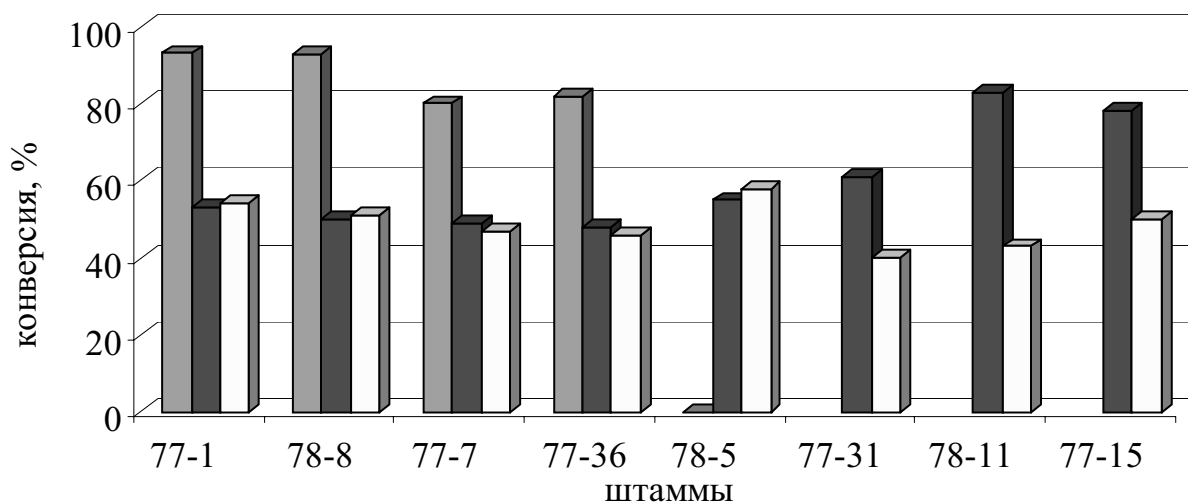
Штамм	Втор-бутилацетат			Втор-бутанол		
	Выход, %*	Оптическая чистота, % ee	Конфигурация	Выход, %*	Оптическая чистота, % ee	Конфигурация
77-1	100	96	R	100	97	S
77-28	100	86	R	100	90	S
77-25	100	90	R	100	77	S
77-39	100	51	R	100	71	S
79-54	100	99	R	100	98	S
79-59	100	52	R	100	75	S
77-34	100	46	R	93	64	S

*- за 100% выход принят теоретически возможный выход продукта при указанной конверсии рацемического субстрата.

При этом наиболее чистые продукты с количественным выходом образуются при использовании штаммов 77-1 и 79-54 (табл. 1).

3.1.2. Исследование трансформации этил-3-оксибутирата

Кинетические исследования трансформации рацемического этил-3-оксибутирата, выполненные при различных начальных концентрациях субстрата (3 и 5 г/л), показали, что 5 штаммов (77-1, 77-7, 78-8, 77-36 и 78-5) проявляют кинетику типичную для стереоселективных реакций (трансформируют оксифир с конверсией 47-58 % независимо от начальной концентрации субстрата) (рис. 3). Остальные штаммы (77-31, 78-11 и 77-15) трансформируют субстрат полностью при низких концентрациях этил-3-оксибутирата.



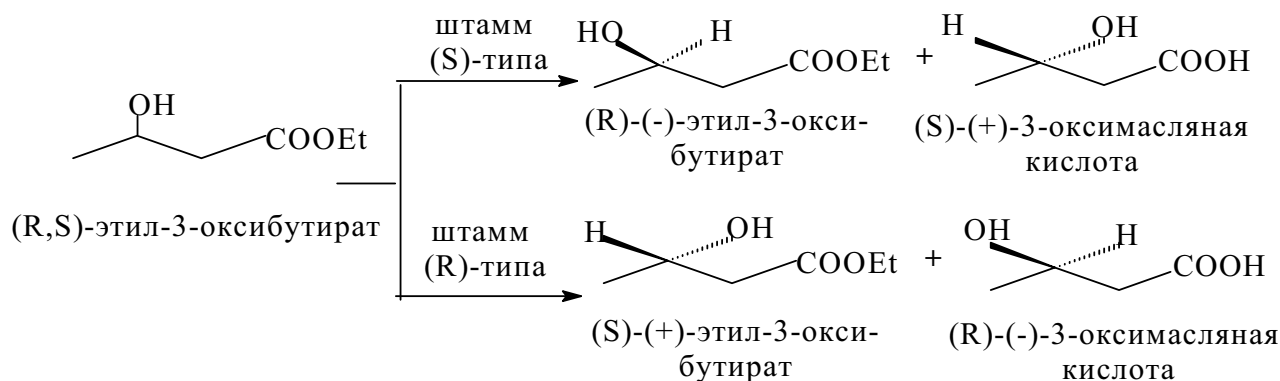
■ (S)-(+)- этил-3-оксибутират - 5 г/л; (R,S)-этил-3-оксибутират: ■ - 3г/л □ - 5г/л

Рис. 3. Конверсия гидролиза этил-3-оксибутирата микроорганизмами:

условия реакции: pH= 7,0; t=30 °С; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Использование в качестве субстрата S-энантиомера этил-3-оксибутирата позволило выявить, что 4 штамма (77-1, 78-8, 77-36 и 77-7) в течение 7 часов гидролизуют этот энантиомер на 80-90 %. В то же время, бы-

ло обнаружено, что штамм 78-5 вообще не конвертирует этот энантиомер (рис. 3). Это указывает на наличие ферментов S-типа у штаммов 77-1, 78-8, 77-36 и 77-7, а также на функционирование гидролазы R-типа у штамма 78-5.



Последнее было подтверждено исследованием оптических свойств продуктов и остаточных субстратов, образующихся при трансформации рацемического этил-3-оксибутирата этими микроорганизмами (табл. 2).

Таблица 2

Выход и оптическая чистота продуктов трансформации

условия реакции: pH= 7,0; t=30 °C; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Штамм	этил-3-оксибутират			3-оксимасляная кислота		
	Выход, %*	Оптическая чистота, % ee	Конфигурация	Выход, %*	Оптическая чистота, % ee	Конфигурация
77-1	100	99	R	100	95	S
77-7	100	80	R	82	71	S
77-36	100	88	R	83	72	S
78-5	100	100	S	100	96	R
78-8	100	96	R	86	92	S

*- за 100% принят теоретически возможный выход продукта при соответствующей конверсии рацемического субстрата.

При этом было найдено, что наиболее чистые оптически активные соединения образуются при использовании S-специфичного штамма 77-1 и R-специфичного штамма 78-5.

3.1.3. Идентификация и исследование патогенных свойств штаммов

Идентификация найденных перспективных штаммов микроорганизмов по основным морфологическим, физиолого-биохимическим признакам, позволила отнести штаммы 77-1 и 79-54 к роду *Bacillus*, а штамм 78-5 к роду *Rhodococcus*. В результате исследований патогенности в Уфимском НИИ медицины труда и экологии человека установлено, что все штаммы авирулентны для млекопитающих, не проявляют инфекционность, инвазивность и токсигенность.

3.2. Разработка биокатализаторов

С целью разработки биокатализаторов на основе найденных штаммов исследовались условия эффективного роста биомассы микроорганизмов и её гидролазной активности.

3.2.1. Подбор питательной среды для выращивания микроорганизмов

Исследование роста микроорганизмов на средах: СР-1–минеральная среда с оливковым маслом; СР-2 – агаризованный гидролизат кильки; СР-3 – агаризованное сусло; показало, что наибольший выход биомассы достигается при выращивании на СР-3 (табл. 3).

Таблица 3

Влияние состава среды на рост и активность микроорганизмов
условия реакции: pH= 7,0; t=30 °С; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Штаммы	Субстрат	Выход биомассы*, %			Активность клеток %		
		СР-1	СР-2	СР-3	СР-1	СР-2	СР-3
<i>Bacillus</i> sp. 79-54	втор-бутилацетат	100	180	190	100	100	98,2
<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	этил-3-оксибутират	100	210	350	100	100	100,8
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	втор-бутилацетат	100	170	230	100	74	86,8
	этил-3-оксибутират	100	170	230	100	76	98,0

за 100% приняты выход и активность 3-х суточной биомассы выращенной на СР-1

Установлено, что активность ферментов у штаммов *Bacillus* sp. 79-54, *Rhodococcus* sp.78-5, не зависит от состава среды, а активность ферментов штамма *Bacillus* sp. 77-1, выращенного на средах СР-2 и СР-3 на 2-26% ниже, чем при выращивании на СР-1. Однако, выход биомассы на СР-3 в 2,3 раза превышает количество биомассы, полученной при наращивании на СР-1. (табл. 3).

Вследствие этого СР-3 признана наиболее эффективной средой для получения всех 3 биокатализаторов.

3.2.2. Зависимость активности биомассы от времени выращивания

Исследование зависимости активности биомассы от времени выращивания в течение 3 суток показало, что у штаммов *Rhodococcus* sp. 78-5 и *Bacillus* sp. 79-54 она не меняется, а у *Bacillus* sp. 77-1 активность зависит от возраста штамма (табл. 4).

Таблица 4

Активность биомассы в зависимости от времени выращивания
условия реакции: pH= 7,0; t=30 °С; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Штаммы	Субстрат	Активность, %		
		1 сутки	2 суток	3 суток
<i>Bacillus</i> sp. 79-54	втор-бутилацетат	100	98,2	102,6
<i>Rhodococcus</i> sp. 78-5	этил-3-оксибутират	100	101,9	104,1
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	втор-бутилацетат	100	87,64	37,45
	этил-3-оксибутират	100	83,3	29,44

Наибольшая активность наблюдается у суточной культуры штамма *Bacillus* sp. 77-1, тогда как у двухсуточной биомассы она значительно падает, что коррелирует с началом интенсивного спорообразования. После 3 суток выращивания споры составляют около 80% биомассы, а активность падает до 37-29%.

Таким образом, время выращивания для штаммов *Bacillus* sp. 79-54, *Rhodococcus* sp. 78-5 составляет трое суток, а для *Bacillus* sp. 77-1 одни сутки.

3.2.3. Влияние предобработки ацетоном на активность клеток

Интенсивное спорообразование *Bacillus* sp. 77-1 было обнаружено также в процессе трансформации и хранения биомассы при комнатной температуре, что коррелировало с потерей ее активности. Для стабилизации активности биомассы была проведена попытка предотвратить дифференциацию клеток путем их обработки ацетоном. При этом было обнаружено увеличение гидролазной активности, что может быть обусловлено известной для липаз активацией при обработке некоторыми органическими растворителями, а также возрастанием проницаемости мембраны (табл.5).

Таблица 5

Исследование влияния предобработки ацетоном на активность

условия реакции: pH= 7,0; t=30 °C; время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5 г/л.

Штаммы	Субстрат	Активность, %			
		Сырая биомасса		Обезвоженные ацетоном клетки	
		1 цикл	6 цикл	1 цикл	6 цикл
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	втор-бутилацетат	100	66*	110	106
	этил-3-оксибутират	100	88	219	219
<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	этил-3-оксибутират	100	82	233	211
<i>Bacillus</i> sp. 79-54	втор-бутилацетат	100	58	158	152

за 100% принята активность необработанной биомассы в 1 цикле; * активность - в 3 цикле

Обработка ацетоном сырой биомассы всех найденных штаммов, привела к повышению и стабилизации их активности в процессах гидролиза. Так, активность обезвоженных клеток за 6 циклов трансформации падает на 4-9%, а активность сырой биомассы падает на 12-42% (табл.5). Вследствие этого использование ацетоновых порошков в качестве катализаторов предпочтительнее, чем использования сырой биомассы.

3.3. Исследование влияния условий на активность предобработанной ацетоном биомассы при гидролизе этил-3-оксибутирата и втор-бутилацетата

С целью поиска оптимальных условий трансформации этил-3-оксибутирата и втор-бутилацетата изучено влияние кислотности среды (pH), температуры, начальной концентрации субстрата и соразтворителя на активность биокатализаторов.

3.3.1. Влияние pH

Установлено, что при разделении рацемического этил-3-оксибутирата максимальная активность у штамма *Bacillus* sp. 77-1 наблюдается при pH = 8.0, у *Rhodococcus* sp.78-5 при pH=7.5, а при разделении втор-бутилацетата у *Bacillus* spp. 79-54 и 77-1 – при pH=7,5 (рис. 4а).

3.3.2. Влияние температуры

В результате исследования зависимости активности биокатализаторов от температуры установлено, что штамм *Bacillus* sp. 77-1 наиболее активно гидролизует этил-3-оксибутират при температуре 34 °C, штамм *Rhodococcus* sp.78-5

при 35 °С. При гидролизе втор-бутилацетата штамм *Bacillus* sp. 77-1 наиболее активен при температуре 30 °С, а штамм *Bacillus* sp. 79-54 – при 35 °С (рис.4б).

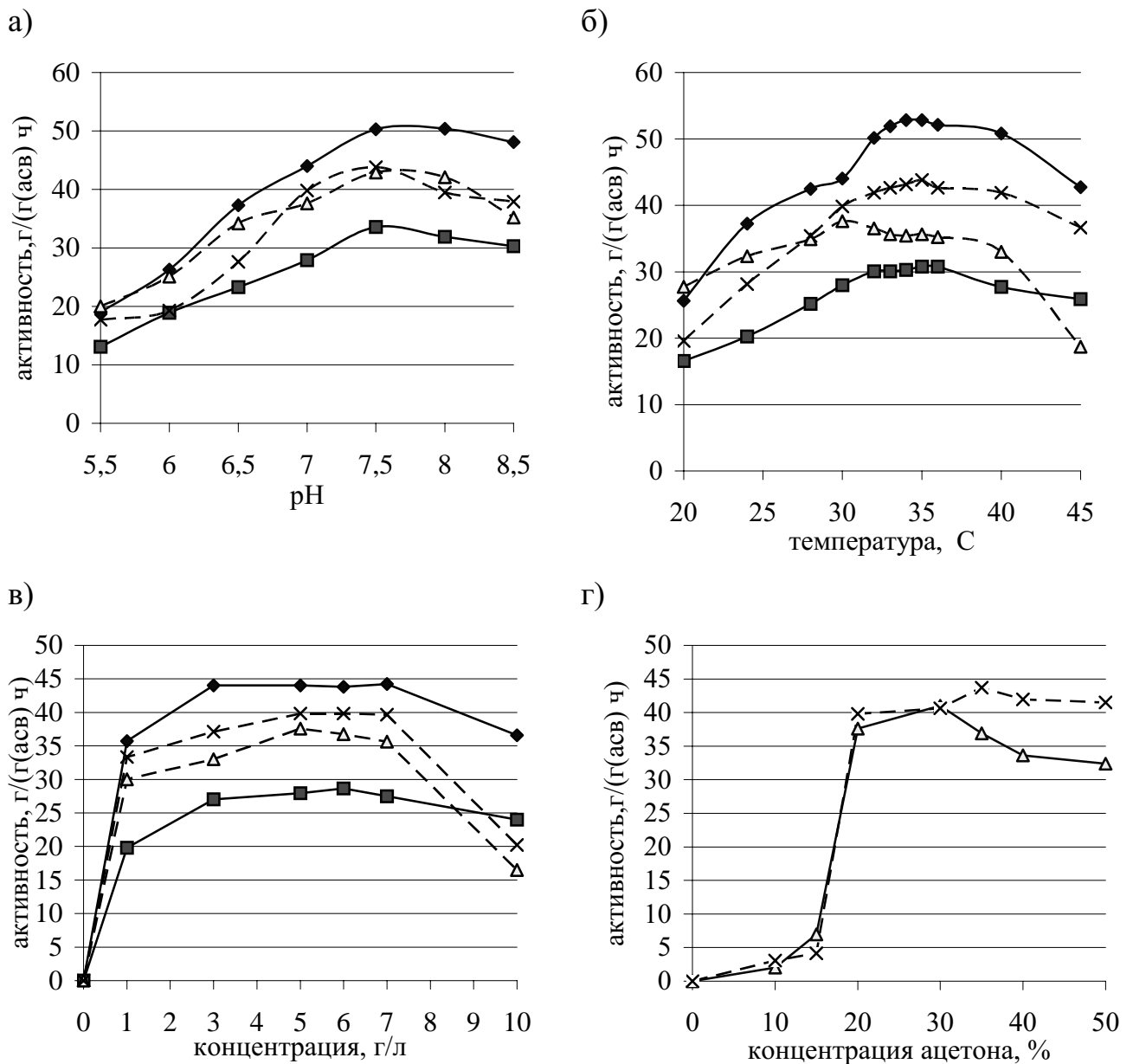


Рис. 4. Зависимость активности биокатализаторов от а) рН, б) температуры, в) начальной концентрации субстрата, г) концентрации ацетона в реакционной смеси; в процессах гидролиза этил-3-оксибутирата (—◆— 77-1, —■— 78-5) и втор-бутилацетата (—△— 77-1, —×— 79-54).

3.3.3. Зависимость активности биокатализаторов от начальной концентрации субстрата

Показано, что штамм *Bacillus* sp. 77-1 наиболее эффективно трансформирует этил-3-оксибутират при начальной концентрации субстрата 7 г/л, штамм *Rhodococcus* sp.78-5 при 6 г/л. При разделении втор-бутилацетата штамм *Bacillus* sp. 77-1 эффективно работает при начальной концентрации субстрата 5 г/л, штамм *Bacillus* sp. 79-54 – при 7 г/л (рис.4в).

3.3.4. Исследование влияния соразтворителя на гидролиз втор-бутилацетата.

Исследование влияния соразтворителя на гидролиз втор-бутилацетата, показало, что концентрация ацетона, обеспечивающая максимальную активность биокатализатора, составляет 30 % от общего объема реакционной смеси для штамма *Bacillus* sp. 77-1 и 35% для *Bacillus* sp. 79-54 (рис. 4г).

3.4. Препаративный синтез оптических изомеров этил-3-оксибутирата, втор-бутилацетата, втор-бутанола и оксимасляной кислоты.

Для получения препаративных количеств оптически активных этил-3-оксибутирата, втор-бутилацетата, втор-бутанола и оксимасляной кислоты разработана принципиальная схема кинетического разделения рацемических смесей гидролизом эфиров в воде.

3.4.1. Принципиальная схема кинетического разделения рацемических смесей этил-3-оксибутирата и втор-бутилацетата

На основе произведенных исследований разработана схема препаративного получения оптических изомеров путем энантиоселективного гидролиза втор-бутилацетата или этил-3-оксибутирата полученными биокатализаторами состоящая из 3 стадий: 2 общие для обоих субстратов – получение биокатализаторов и кинетическое разделение рацематов гидролизом в водной фазе, и 3 стадии – выделение полученных изомеров из реакционной смеси (рис. 5).

1 стадия включает в себя: выращивание биомассы в ферментере **1** (рН=7.0, t= 30⁰С) в течение 1-3 дней в зависимости от штамма, отделение биомассы от среды в центрифуге (**Ц**) **2**, обработку её ацетоном (ацетон : биомасса, 3:1) в ёмкости (**Е**) **3**, отделение биокатализатора от ацетона в **Ц** **4**. Полученный биокатализатор может храниться при –15⁰С не менее 9 месяцев.

На 2 стадии проводится кинетическое разделение рацемических смесей эфиров в 0,05М фосфатном буфере (рН=7,5-8,0; t= 30-35⁰С; начальная концентрация субстрата 5-7 г/л; концентрация соразтворителя при разделении втор-бутилацетата 30-35 % об. в зависимости от биокатализатора концентрация которого 30 г/л) в течение 5 часов в реакторе (**Р**) **5** с последующим отделением реакционной смеси от биокатализатора в **Ц** **6**. Биокатализатор может использоваться повторно не менее 6 циклов трансформации не теряя активности.

На 3 стадии в случае разделения втор-бутилацетата (**Г**) реакционная смесь поступает в экстрактор (**Э**) **7**, где высаливается NaCl (до насыщения), а затем продукты реакции экстрагируются диэтиловым эфиром (**ДЭ**) (эфир: смесь, 3:1). Эфирная фракция обезвоживается Na₂SO₄ в **Е** **8** и затем **ДЭ** отгоняется на вакуумно-роторном испарителе (**ВРИ**) **9**. Полученная смесь изомеров разделяется методом жидкостной хроматографии (**ЖХ**) на колонне (**К**) **11** наполненной силикагелем (элюент гексан: этилацетат, 3:1). Фракции содержащие оптически активные втор-бутанол и втор-бутилацетат собираются в **Е** **12** и **Е** **13**, соответственно и далее элюент отгоняется на **ВРИ** **14** и **15**, а продукты поступают в **Е** **16** и **Е** **17**.

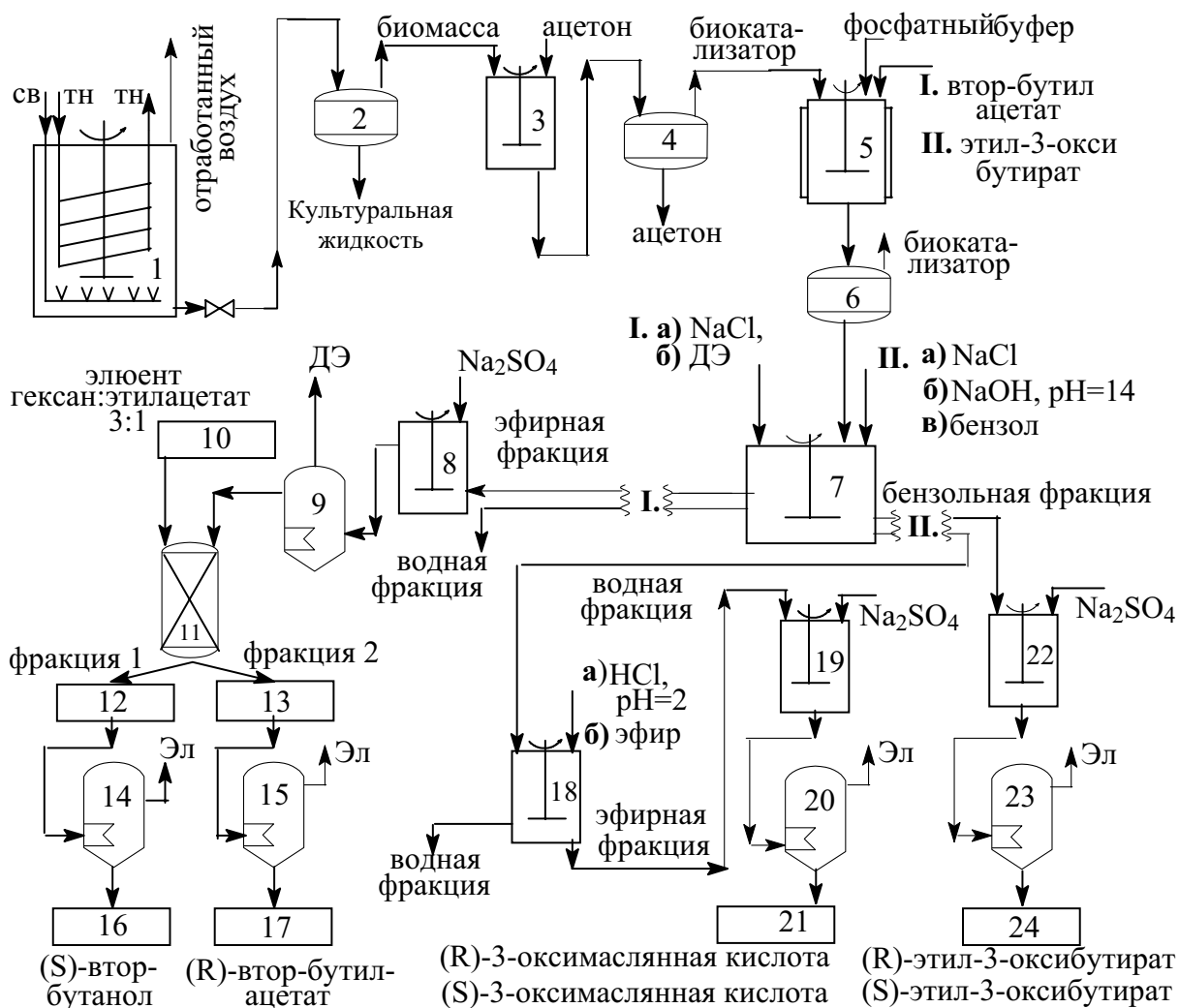


Рис. 5. Принципиальная схема кинетического разделения втор-бутилацетата и этил-3-оксибутирата гидролизом в водной фазе.

При разделении продуктов гидролиза этил-3-оксибутирата (**II**) реакци-онная смесь поступает в Э 7, где высаливается NaCl (до насыщения), подщелачивается NaOH до pH=14, а затем остаточный субстрат экстрагируется бензолом (бензол: смесь, 3:1). Бензольная фракция обезвоживается Na₂SO₄ в Е 22 и затем бензол отгоняется на ВРИ 23. Оптически активный этил-3-оксибутират поступает в Е 24. Водная фракция поступает Э 18, где подкисляется HCl до pH=2, а затем оксимасляная кислота экстрагируется ДЭ. Эфирная фракция обезвоживается Na₂SO₄ в Е 19 и затем ДЭ отгоняется на ВРИ 20. Оптически активная 3-оксимасляная кислота поступает в Е 21.

3.4.2. Получение препаративных количеств (R)-(-)- и (S)-(+)- энантиомеров этил-3-оксибутирата и оксимасляной кислоты

В результате кинетического разделения 42 г рацемического этил-3-оксибутирата в течение 6 циклов по разработанной схеме (рис. 5) обезвожен-

ными ацетоном клетками штаммов *Rhodococcus* sp.78-5 и *Bacillus* sp. 77-1 получены (R)-(-)- и (S)-(+)- оптические изомеры этил-3-оксибутирата и 3-оксимасляной кислоты выходом 80-90% (от теоретически возможного при данной конверсии эфира) и оптической чистотой 95-100% ее (табл. 6).

Таблица 6

Выход и оптическая чистота продуктов гидролиза этил-3-оксибутирата за 6 циклов штаммами *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp.78-5 в оптимальных условиях

Биокатализатор*	Остаточная активность, %	(R)-(-)-этил-3-оксибутират		(S)-(+)- этил-3-оксибутират		(R)-(-)-3-оксимасляная кислота		(S)-(+)-3- оксимасляная кислота	
		выход, г	ее, %	выход, г	ее, %	выход, г	ее, %	выход, г	ее, %
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	100	18,9	99	-	-	-	-	17	95
<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	90	-	-	18,5	100	17,4	96	-	-

*-концентрация: биокатализатора – 30 г/л, субстрата – 7 г/л;

Из таблицы 6 видно, что данные биокатализаторы могут использоваться более 6 циклов трансформации. Активность биокатализатора на основе штамма *Bacillus* sp. 77-1 после 6 циклов не меняется, а в случае биокатализатора на основе штамма *Rhodococcus* sp.78-5 падает незначительно.

3.4.3. Препаративный синтез (R)-втор-бутилацетата и (S)-втор-бутанола

Получение препаративных количеств втор-бутилацетата и втор-бутанола проводили по принципиальной схеме представленной на рисунке 5.

Таблица 7

Выход и оптическая чистота продуктов гидролиза втор-бутилацетата штаммами *Bacillus* sp. 77-1 и *Bacillus* sp. 79-54 в оптимальных условиях

Биокатализатор		(R,S)-вторбутилацетат, г	Количество циклов	Остаточная активность, %	(S)-(-)-втор-бутанол		(R)-(+)- вторбутилацетат	
штамм	масса, г				выход, г	ее,%	выход, г	ее,%
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	30	42	6	90	17,8	98	17	96
<i>Bacillus</i> sp. 79-54	30	42	6	95	18,2	96	18,5	99

При кинетическом разделении 42 г рацемического втор-бутилацетата в течение 6 циклов штаммами *Bacillus* sp. 77-1 и *Bacillus* sp. 79-54 получены (S)-(+)-втор-бутанол и (R)-(-)- втор-бутилацетат с выходом 80-88% (от теоретически возможного при данной конверсии эфира) и оптической чистотой 96-99% ее (табл. 7). Остаточная активность биокатализаторов после 6 циклов трансформации сохраняется на уровне 90-95%.

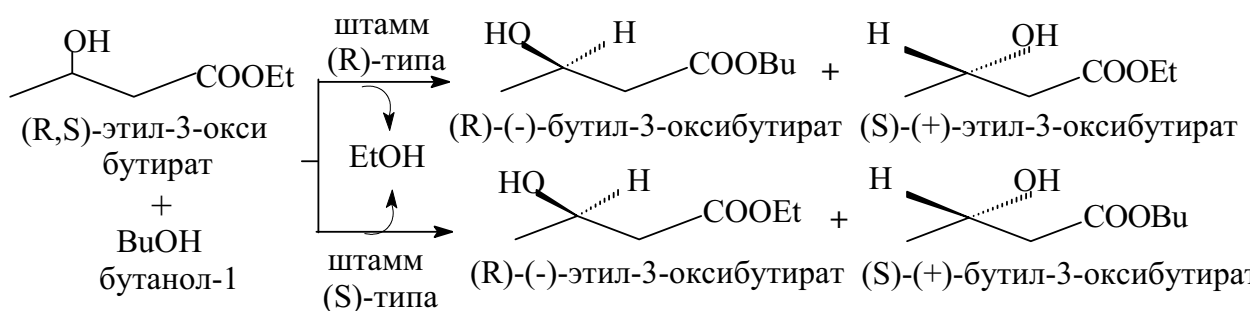
3.5. Разработка препаративных методов кинетического разделения рацемических этил-3-оксибутирата и втор-бутилацетата в органической среде

Известно, что липазы микроорганизмов могут катализировать не только гидролиз эфиров, но и реакции их трансэтерификации (в том числе реакции алкоголиза и ацидолиза эфиров), протекающих в органической фазе. При

этом в ряде случаев реакции этерификации могут оказаться более эффективными для получения оптически активных соединений. Кроме того, проведение реакции в органической фазе может облегчить задачу выделения целевых оптически активных соединений, образующихся при трансформации. В связи с этим было целесообразно исследовать возможность применения разработанных биокатализаторов в реакциях алкоголиза и ацидолиза рацемических смесей исследуемых эфиров. В настоящей работе были изучены реакции энантиоселективного алкоголиза этил-3-оксибутирата и ацидолиза вторбутанола в гексане.

3.5.1. Алкоголиз этил-3-оксибутирата н-бутанолом

Изучение алкоголиза этил-3-оксибутирата н-бутанолом преобразованными ацетоном клетками штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp. 78-5 показало, что степень его превращения (~50%) и выход продукта (100% от теоретически возможного при данной конверсии эфира) не зависят от концентрации субстрата. Это указывает на то, что органический растворитель и продукты реакции не оказывают ингибирующего действия на ферментную систему штаммов.



Проведение трансформации в течение 6 циклов не выявило значительного снижения активности биокатализаторов, что говорит об их стабильности в органическом растворителе.

Таблица 8

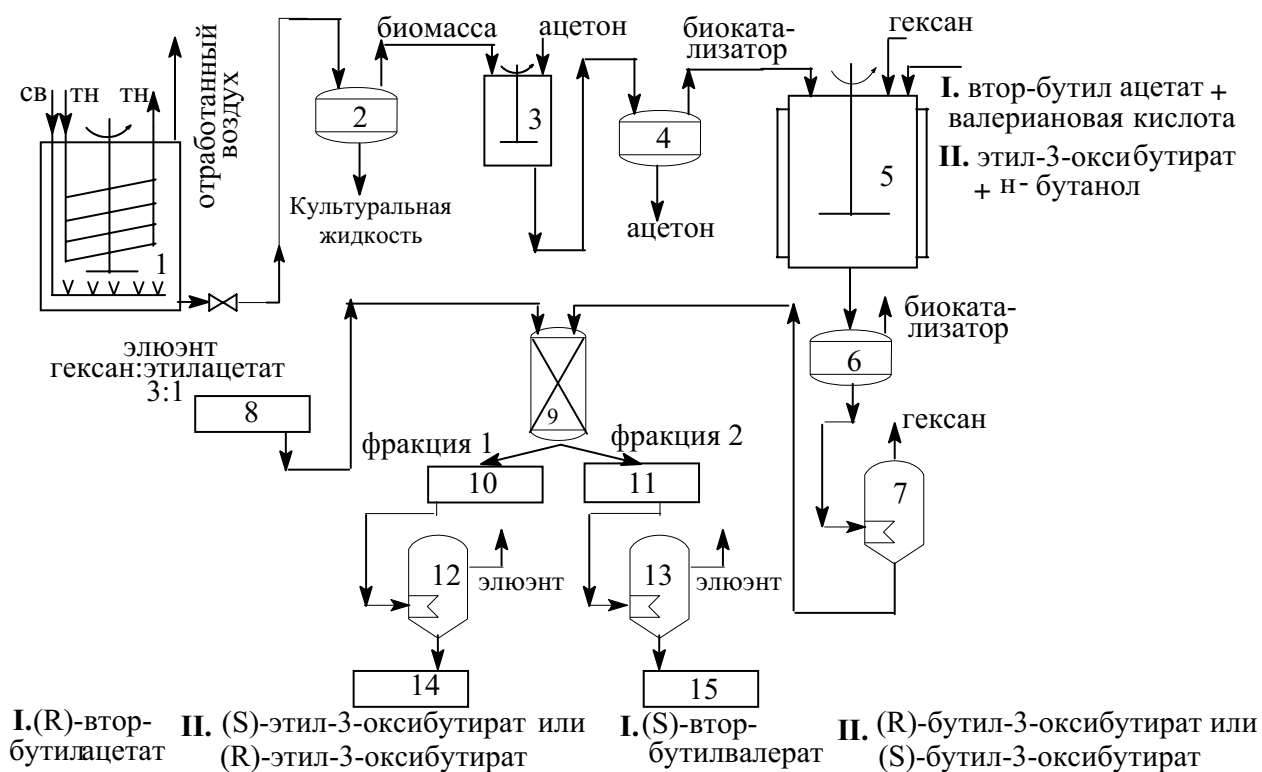
Выход и оптическая чистота этил-3-оксибутирата, полученного алкоголизом бутанолом-1 штаммами *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp.78-5 в гексане время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 6,6 г/л (субстрат : реагент, 1:1,1).

Биокатализатор		(R,S)-этил-3-бутират, г	Количество циклов	Остаточная активность, %	(R)-(-)-этил-3-оксибутират		(S)-(+)-этил-3-оксибутират	
штамм	масса, г				выход, г	ее, %	выход, г	ее, %
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	30	39,6	6	84	16,63	97	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	30	39,6	6	90	-	-	16,8	100

Катализируемый штаммами *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp.78-5 алкоголиз 39,6 г рацемического этил-3-оксибутирата бутанолом-1 в гексане в течение 6 циклов (6,6 г эфира за 1 цикл) с последующим разделением продуктов методом жидкостной хроматографии позволил получить продукты с выходом 80-90% (от теоретически возможного при данной конверсии эфира) и оптической чистотой 97-100% ee (табл. 8).

3.5.1. Принципиальная схема кинетического разделения рацемических смесей этил-3-оксибутирата и втор-бутилацетата

Полученные результаты позволили разработать научно обоснованную принципиальную схему кинетического разделения рацемических эфиров в органической фазе, которая включает в себя 3 стадии: получение биокатализаторов, кинетическое разделение рацематов в гексане, и выделение полученных изомеров из реакционной смеси (рис. 6).



1-ферментер; 2,4,6-центрифуги; 3-ёмкость с мешалкой; 5-реактор; 7,12,13- вакуумно-ротаторные испарители; 8,10,11,14,15 – ёмкости; 9- колонна ЖХ, св –стерильный воздух, тн – теплоноситель.

Рис. 6. Принципиальная схема кинетического разделения втор-бутилацетата и этил-3-оксибутирата в органической фазе.

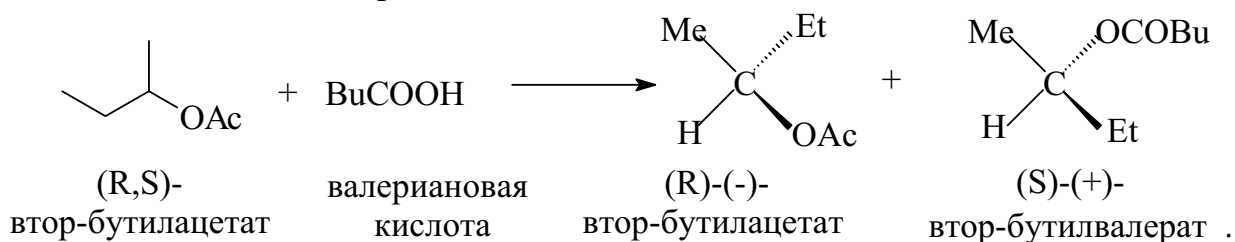
Стадия получения биокатализаторов аналогична стадии получения биокатализаторов в схеме представленной на рисунке 5. На 2 стадии проводится кинетическое разделение рацемических смесей втор-бутилацетата ацидолизом валериановой кислотой (1:1,1) или этил-3-оксибутирата алкоголизом бутанолом-1 (1:1,1) в гексане (начальная концентрация субстрата 50 мМ/л; $t = 30-35^{\circ}\text{C}$, в зависимости от биокатализатора концентрация которого 30 г/л) в течение 5 часов в **Р 5** с последующим отделением реакционной смеси от биокатализатора в **Ц 6**. Биокатализатор может использоваться повторно не менее 6 циклов трансформации не теряя активности.

На 3 стадии гексан отгоняется на **ВРИ 7**. Полученная смесь изомеров разделяется методом ЖХ на **К 11** наполненной силикагелем (элюэнт гексан: этилацетат, 3:1). Фракции содержащие оптические изомеры собираются в **Е**

10 и **Е 11** и далее элюент отгоняется на **ВРИ 12** и **13**, а продукты поступают в **Е 14** и **Е 15**.

3.5.3. Ацидолиз втор-бутилацетата валериановой кислотой

Изучение ацидолиза втор-бутилацетата (начальная концентрация 2,5 и 5 г/л) валериановой кислотой в течение 6 циклов показало, что активность штамма *Bacillus* sp. 79-54 и конверсия эфира, практически не изменяется, тогда как у штамма *Bacillus* sp. 77-1, активность значительно уменьшается с каждым циклом, что может быть обусловлено инактивацией фермента вследствие воздействия валериановой кислоты.



Применение разработанной принципиальной схемы (рис. 6) разделения рацемических эфиров органической фазе позволило получить (R)-(+)-втор-бутилацетат с выходом 87% (от теоретически возможного при данной конверсии эфира) и оптической чистотой 99% ее.

Таблица 9

Выход и оптическая чистота (R)-(+)-втор-бутилацетата, полученного парциальным ацидолизом рацемического втор-бутилацетата валериановой кислотой, катализируемого обработанными ацетоном клетками штамма *Bacillus* sp. 79-54 в гексане

время 5 ч.; начальная концентрация субстрата 5,8 г/л (субстрат : реагент, 1:1,1).

Биокатализатор		(R,S)- вторбутил- ацетат, г	Коли- чество циклов	Остаточная активность, %	(R)-(+)- вторбутилацетат	
штамм	масса, г				выход, г	ее,%
<i>Bacillus</i> sp. 79-54	30	34,8	6	88	15,1	99

В результате сравнительного анализа принципиальных схем разделения в водной (рис. 5) и в органической (рис. 6) средах установлено, что получение оптически активных остаточных субстратов – втор-бутилацетата и этил-3-оксибутирата предпочтительнее проводить в гексане вследствие меньшей трудоёмкости и большей эффективности разделения.

3.6. Исследование синтетического потенциала биокатализаторов в некоторых обменных реакциях в органическом растворителе

Многие липазы, согласно литературным данным, обладают широкой субстратной специфичностью, могут катализировать наряду с гидролизом, другие типы реакций. В связи с этим была исследована возможность энантиоселективного катализа в обменных реакциях с другими субстратами. Были изучены реакции аммонолиза и алкоголиза глицидилового эфира метакриловой кислоты и алкоголиза N-3Е-пентен-2-ил-орто-

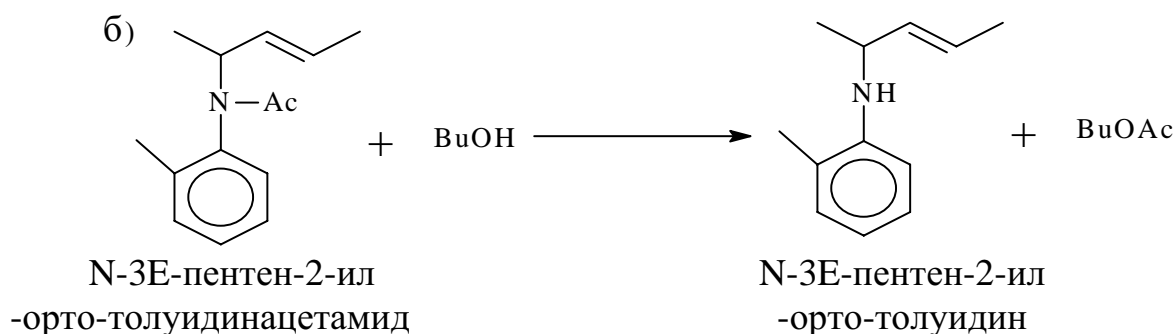
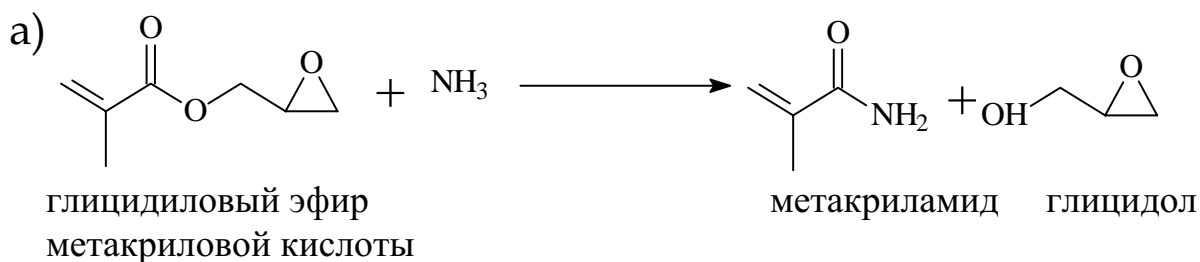
толуидинацетамида с помощью обезвоженной ацетоном биомассы штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp. 78-5 (табл. 10).

Таблица 10

Конверсия глицидилового эфира метакриловой кислоты и N-3E-пентен-2-ил-орто-толуидин ацетамида в реакциях аммонолиза и/или алкоголиза

Субстрат	Акцептор кислотной части	Конверсия, %			
		<i>Bacillus</i> sp.77-1		<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	
		3 г/л	6 г/л	3 г/л	6 г/л
глицидиловый эфир метакриловой кислоты	NH ₃	53	51	49	50
	Бутанол-1	0	0	-	-
	Пентанол-2	0	0	-	-
N-3E-пентен-2-ил-орто-толуидинацетамид	Бутанол-1	100	100	100	100

В результате исследования трансформации субстратов в течение 8 часов при начальных концентрациях 3 и 6 г/л установлено, что, только аммонолиз глицидилового эфира метакриловой кислоты данными биокатализаторами проходит с 50% конверсией характерной для стереоселективного процесса (табл. 10).



При катализе алкоголиза N-3E-пентен-2-ил-орто-толуидинацетамида, предоставленного профессором Абдрахмановым И.Б. (ИОХ УНЦ РАН), бутанолом-1 найденные биокатализаторы не проявили стереоспецифичных свойств трансформируя субстрат на 100% (табл. 10).

3.6.1. Влияние источника аммиака на активность биокатализаторов

Исследование влияния источника аммиака на активность биокатализаторов позволило установить, что использование бикарбоната аммония вместо аммиака увеличивает активность биокатализаторов *Rhodococcus* sp. 78-5 и *Bacillus* sp. 77-1 и 50% конверсия глицидилового эфира метакриловой кислоты достигается уже к 5 часам реакции (рис. 7).

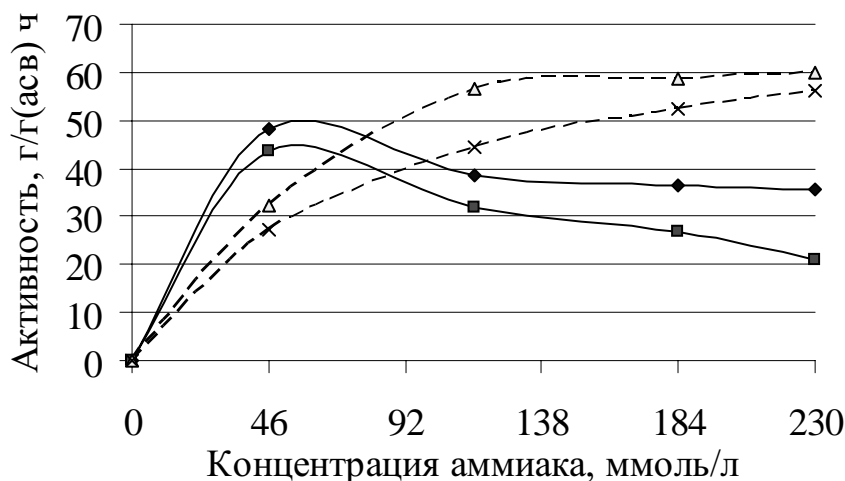


Рис. 7. Зависимость активности штаммов *Rhodococcus* sp. 78-5 и *Bacillus* sp. 77-1 от концентрации аммиака внесенного в виде аммиака (—◆— 78-5, —■— 77-1) и бикарбоната аммония (—△— 78-5, —×— 77-1).

Увеличение активности, по видимому, объясняется тем, что при использовании бикарбоната аммония аммиак вносится в реакционную смесь по мере растворения соли, что создаёт постоянную концентрацию аммиака в реакционной смеси в течение всего процесса аммонолиза.

3.6.2. Влияние концентрации эфира на активность биокатализаторов

Изучение влияния концентрации глицидилового эфира метакриловой кислоты на скорость реакции показало, что с ростом концентрации эфира до 9 г/л активность биокатализаторов почти не меняется, а при дальнейшем увеличении значительно падает (рис. 8).

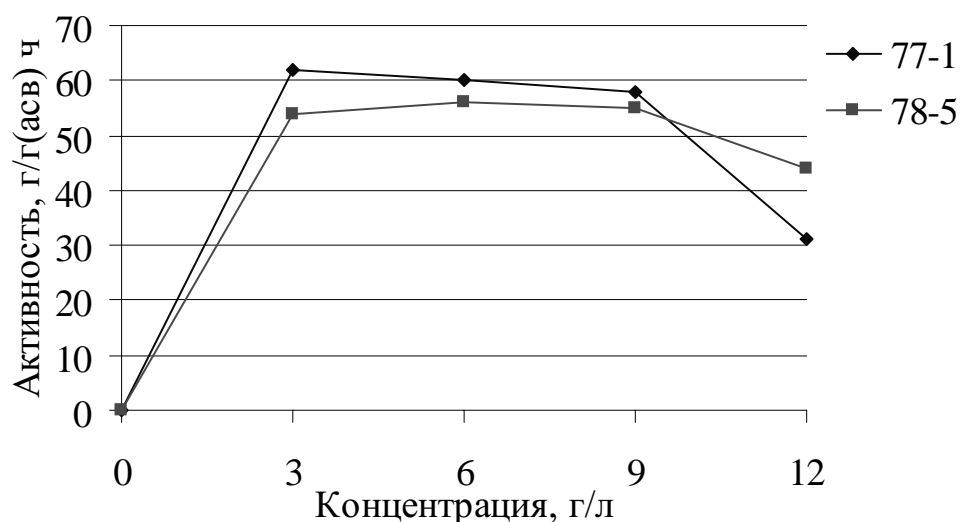


Рис. 8. Зависимость активности биокатализаторов на основе штаммов *Rhodococcus* sp. 78-5 и *Bacillus* sp. 77-1 от концентрации глицидилового эфира метакриловой кислоты.

Изучение возможности многократного использования биокатализаторов при концентрации глицидилового эфира метакриловой кислоты 9,0 г/л и

20,2 г/л бикарбоната аммония в течение 3 циклов показало, что активность биокатализаторов значительно не изменяется.

3.6.3. Получение препаративных количеств продуктов аммонолиза глицидилового эфира метакриловой кислоты

Использование принципиальной технологической схемы разделения рацемических эфиров в органической среде (рис. 6) в течение 3 циклов при аммонолизе 27 г глицидилового эфира метакриловой кислоты биокатализаторами на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp.78-5 позволило получить (S)-(+)- и (R)-(-)-глицидол с выходом 84-89% и оптической чистотой 97-98% ее (табл. 11).

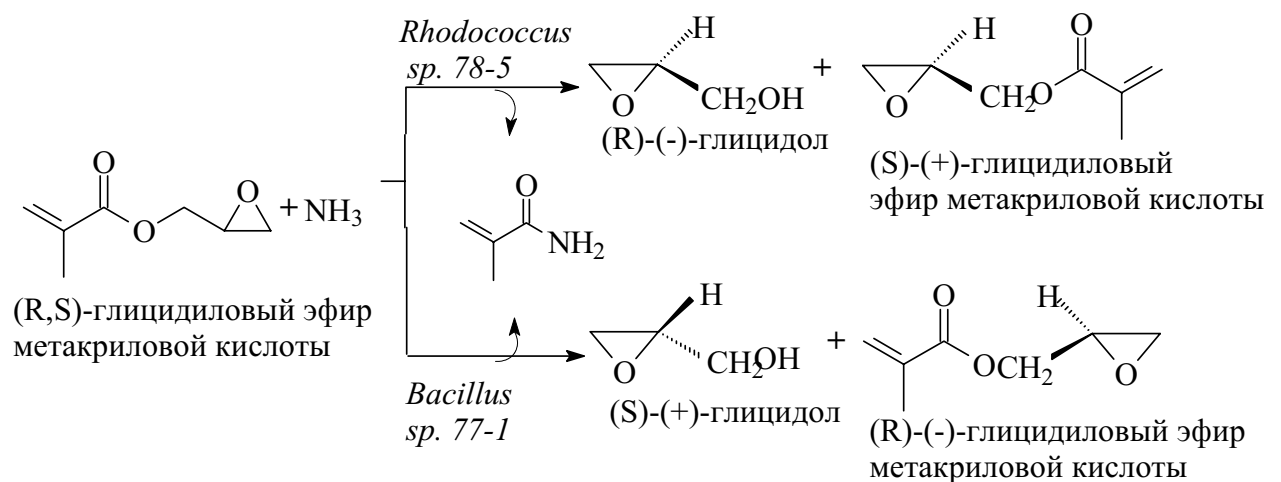


Таблица 11

Результаты кинетического разделения рацемического глицидилового эфира метакриловой кислоты биокатализаторами на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp. 78-5 аммонолизом в метилизобутилкетоне

Биокатализатор		Количество субстрата, г	Количество циклов	Остаточная активность, %	(R)-(-)- глицидол		(S)-(+)- глицидол	
штамм	масса, г				выход, г	ее, %	выход, г	ее, %
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	30	27	3	80	-	-	11,3	98
<i>Rhodococcus</i> sp.78-5	30	27	3	98	12	97	-	-

Оценка оптической чистоты производилась по стандартным углам вращения: для (S)-(+)-глицидола $[\alpha]^{24} = +22,5^{\circ}$ ($c=1, \text{CH}_3\text{OH}$); для (R)-(-)-глицидола $[\alpha]^{24} = -22^{\circ}$ ($c=1, \text{CH}_3\text{OH}$).

3.7. Исследование активности биокатализаторов от условий и времени хранения

Осуществлен поиск способа длительного хранения биокатализаторов.

Установлено, что при комнатной температуре сырая биомасса уже через сутки теряет в среднем до 20 % активности, в то же время активность обработанной ацетоном биомассы практически не изменяется.

Изучение хранения сырой биомассы при температуре -10°C в течение 9 месяцев показало, что она теряет до 70% активности уже за 6 месяцев.

Таблица 12

Зависимость активности ацетоновых порошков от длительности хранения

Штаммы	Процесс	Активность, %			
		1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев
Bacillus sp. 79-54	Гидролиз втор-бутилацетата	100	100	98	96
	Ацидолиз втор-бутилацетата	100	100	95	99
Rhodococcus sp. 78-5	Гидролиз этил-3-оксибутирата	100	100	97	97
	Алкоголиз этил-3-оксибутирата	100	99	99	99
	Аммонолиз глицидилового эфира метакриловой кислоты	100	100	97	96
Bacillus sp. 77-1	Гидролиз втор-бутилацетата	100	100	90	85
	Ацидолиз втор-бутилацетата	100	100	89	82
	Гидролиз этил-3-оксибутирата	100	100	100	99
	Алкоголиз этил-3-оксибутирата	100	100	97	96
	Аммонолиз глицидилового эфира метакриловой кислоты	100	99	99	99

*-за 100% принята активность свежего ацетонового порошка

В тоже время, установлено, что хранение биокатализаторов в виде обезвоженных ацетоном клеток является более эффективным чем хранение замороженной сырой биомассы. Показано, что активность обработанных ацетоном клеток в большинстве исследуемых процессов снижается незначительно даже через 9 месяцев хранения. Исключение составил штамм *Bacillus sp. 77-1*, который в процессах гидролиза и ацидолиза втор-бутилацетата после 9 месяцев хранения проявлял активность на 15-17% ниже исходной.

Выводы

1. В результате скрининга микроорганизмов найдены и идентифицированы 3 новых непатогенных штамма: *Bacillus sp. 77-1*, *Bacillus sp. 79-54* и *Rhodococcus sp. 78-5*, способные катализировать энантиоселективный гидролиз рацемических втор-бутилацетата и/или этил-3-оксибутирата.

2. Установлено, что использование агаризованного сусли (3⁰Б) приводит наибольшему выходу биомассы микроорганизмов, при этом наиболее высокая активность у штаммов *Bacillus sp. 79-54* и *Rhodococcus sp. 78-5* достигается через 72 часа выращивания, а у штамма *Bacillus sp. 77-1* – через 24 часа.

3. Установлено, что обработка ацетоном биомассы микроорганизмов повышает её каталитическую активность в процессах гидролиза втор-бутилацетата (в 1,1 и 1,6 раза для штаммов *Bacillus sp. 77-1* и *Bacillus sp. 79-54*, соответственно) и этил-3-оксибутирата (в 2,2 и 2,3 раза для штаммов *Bacillus sp. 77-1* и *Rhodococcus sp. 78-5*, соответственно), а также увеличивает стабильность и время хранения биокатализаторов на основе этих штаммов до 9 месяцев без значительного снижения активности. Доказана возможность многократного использования полученных биокатализаторов.

4. Найдены оптимальные параметры энантиоселективного гидролиза (температура 30-35 °С; pH=7,5-8,0; начальная концентрация субстрата 5-7 г/л; концентрация соразтворителя 30-35% об. в зависимости от типа штамма) втор-бутилацетата и этил-3-оксибутирата для полученных биокатализаторов.

5. Научно обоснована принципиальная технологическая схема получения энантиоселективных биокатализаторов парциального гидролиза рацемических эфиров и их кинетического разделения с выделением индивидуальных R- или S-энантиомеров: (R)-(-)-втор-бутилацетата (96-99 % ee), (S)-(+)-втор-бутанола (96-98 % ee), (R)-(-)- или (S)-(+)- этил-3-оксибутирата (99 и 100 % ee, соответственно) и (R)-(-)- или (S)-(+)- 3-оксимасляной кислоты (96 и 95 % ee, соответственно) с высокими выходами (80-90 %).

6. Разработаны методы получения R- или S- этил-3-оксибутирата (97 и 100 % ee, соответственно) путем парциального алкоголиза рацемического этил-3-оксибутирата бутанолом-1, катализируемого в гексане обезвоженными ацетоном клетками штаммов *Bacillus* sp. 77-1, *Rhodococcus* sp. 78-5.

7. Разработан метод получения R-втор-бутилацетата с оптической чистотой 99% ee путем энантиоселективного ацидолиза рацемического втор-бутилацетата валериановой кислотой, катализируемого в гексане обезвоженными ацетоном клетками штамма *Bacillus* sp. 79-54.

8. Разработаны методы получения R- или S- глицидола высокой оптической чистоты (97-98% ee) путем парциального аммонолиза рацемического глицидилового эфира метакриловой кислоты аммиаком (бикарбонатом аммония), катализируемого в метилизобутилкетоне обезвоженными ацетоном клетками штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Rhodococcus* sp. 78-5.

9. Научно обоснована принципиальная технологическая схема получения энантиоселективных биокатализаторов парциального алкоголиза этил-3-оксибутирата бутанолом-1, ацидолиза втор-бутилацетата валериановой кислотой и аммонолиза глицидилового эфира метакриловой кислоты карбонатом аммония в органическом растворителе и их кинетического разделения с выделением индивидуальных R- и S- энантиомеров: (R)-(-)-втор-бутилацетата (99 % ee), (R)-(-)- или (S)-(+)- этил-3-оксибутирата (97 и 100 % ee, соответственно) и (R)-(-)- или (S)-(+)- глицидола (97 и 98% ee, соответственно) с высоким выходом (80-90 %).

Список публикаций

1. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Мубараков А.И., Зорин В. В., Поиск микроорганизмов - продуцентов липолитических ферментов.// Матер. 49 науч.-техн. конф. студ., асп. и молод. уч. - Уфа: Изда-во УГНТУ, 2001, с. 156;

2. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Мубараков А.И., Зорин В. В., Выделение липолитических ферментов и их применение в синтезе оптически активных соединений.// Матер. 49 науч.-техн. конф. студ., асп. и молод. уч. - Уфа: Изда-во УГНТУ, 2001, с. 31;

3. Коновалов А.А., Байракова Л.В., Зорин В., Разделение рацемических эфиров вторбутилацетата и этил-3-оксибутирата интактными клетками

микроорганизмов. //XII Междунар. конф. по производству и применению химических реактивов и реагентов «Реактив-99», - Уфа-М., 1999. с.83;

4. Коновалов А.А., Байракова Л.В., Зорин В.В. Разработка метода микробиологического энантиоселективного гидролиза рацемического этилового эфира 3-оксимасляной кислоты. //Междунар. науч.-практич. Конф. «Сервис большого города», - Уфа, 1999. с.46;

5. Коновалов А.А., Мубараков А.И., Меленберг С.В., Зорин В.В. Разделение рацемических смесей спиртов с помощью липолитических микроорганизмов. //Матер. V междунар. конф. по интенсификации нефтехимических процессов «Нефтехимия-99», - Нижнекамск, 1999. с. 96;

6. Коновалов А.А., Мубараков А.И., Меленберг С.В., Байракова Л.В., Зорин В.В. Поиск микроорганизмов, являющихся биокатализаторами в процессах разделения рацемических смесей энантиомеров вторичных спиртов. // Тезисы докладов XXXVII междунар. науч. студ. конф., -Новосибирск, 1999, с. 134;

7. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Разработка микробиологического метода энантиоселективного гидролиза этилового эфира 3-гидрокибутирата. // Конф. «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины», посвящ.150-летию со дня рождения академика И.П. Павлова, - Уфа, 1999. с. 33;

8. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование стереоселективности гидролиза этилового эфира 3-оксимасляной кислоты микроорганизмами. // Вторая междунар. конф. молодых уч. "Актуальные тенденции в органическом синтезе на пороге новой эры" -Санкт-Петербург. 1999. с 169;

9. Коновалов А.А., Н.И. Петухова, В.В. Зорин. Поиск новых штаммов микроорганизмов для синтеза синтонов низкомолекулярных биорегулятов на основе оксикислот. //Заочно науч.-практич. конф. "Биотехнология в ФЦП "Интеграция"", - Санкт – Петербург, 1999. с. 34;

10. Коновалов А.А.,Костина Е.В.Микробиологическое разделение рацемических эфиров вторбутилацетата и этил-3-оксибутирата.//Матер. XXXVIII Междунар. науч. студ. конф."Студент и научно-технический прогресс", -Новосибирск, 2000 . 101-102.

11. Коновалов А.А.,Костина Е.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Микробиологическое разделение рацемического эфира этил-3-оксибутирата.// Тезисы докл. XIII Междунар. науч.-техн. конф. Хим. реакт., реаг. и проц. малотоннажной хим. «Реактив-2000», -Уфа-Москва, 2000. с.190

12. Коновалов А.А.,Н.И. Петухова, Г.Ю. Ишмуратов, Р.Я. Харисов, В.В. Зорин. Гидролазная активность микроорганизмов для кинетического разделения рацемического этил-3-оксибутирата.- БХЖ, 2000, Том 7, №5,с. 34-36

13. Коновалов А.А., Н.И. Петухова, В.В. Зорин. Разработка метода микробиологического разделения рацемического втор-бутилацетата. // БХЖ, 2000, Том 7, №5, с. 49-50

14. Коновалов А.А., Габдульманова Л.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Кинетическое разделение втор-бутилацетата в органическом растворителе. // Матер. XXXIX Междунар. науч. студ. конф., -Новосибирск, 2001 г. с.55

15. Коновалов А.А., Габдульманова Л.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Энантиоселективный алкоголиз этил-3-оксибутирата. // Матер. XXXIX междунар. Науч. студ. конф., - Новосибирск, 2001 г. с.56
16. Коновалов А.А., Кожанова Н.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Энантиоселективное разделение втор-бутилацетата и этил-3-оксибутирата в органическом растворителе штаммом *Bacillus sp.77-1*. // Матер. 51 науч.-тех. конф. студ., асп. и молодых уч. -Уфа, 2001 г. с.110
17. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Разработка методов получения оптически активных синтонов феромонов насекомых – экологически безопасных средств борьбы с вредителями сельского хозяйства // Химическая экология. Школа-семинар. -Уфа 2001. с. 176
18. Коновалов А.А., Мубаракوف А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Разработка энантиоселективных методов разделения рацемических смесей спиртов и эфиров с использованием клеток микроорганизмов. // Научные исследования высшей школы в области химии и химических продуктов: Сб. науч. тр. – Москва, - 2001. С. 81-86.
19. Коновалов А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Аммонолиз эфиров глицидола с использованием клеток липолитических микроорганизмов. // Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях, материалы всероссийской заочной конференции. Четвертый выпуск. Тверь 2002. с. 54-55.