

На правах рукописи

МУБАРАКОВ АРТУР ИЛЬФАТОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ
ПАРЦИАЛЬНОГО АЦИЛИРОВАНИЯ СПИРТОВ**

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
Киреева Наиля Ахняфовна;

кандидат биологических наук
Басченко Игорь Анатольевич.

Ведущая организация Государственное унитарное предприятие
«Опытный завод» АН РБ.

Защита состоится «18» декабря 2002 года в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.289.06 при Уфимском государственном нефтяном техническом университете по адресу: 450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского государственного нефтяного университета

Автореферат разослан 18 ноября 2002 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самойлов Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Синтонами многих низкомолекулярных биорегуляторов являются различные оптически активные спирты и сложные эфиры. Наиболее эффективными способами получения таких соединений считается кинетическое разделение их рацемических смесей парциальным ацилированием с помощью препаратов липаз и карбоксилэстераз, обладающих высокой стереоселективностью.

В литературе имеется большое число работ, убедительно показывающих перспективность использования препаратов внеклеточных и внутриклеточных эстераз микроорганизмов для синтеза многих важнейших синтонов низкомолекулярных биорегуляторов. В то же время остается малоизученным вопрос применения в парциальном ацилировании спиртов интактных клеток микроорганизмов.

Вместе с тем, клетки микроорганизмов с успехом применяются во многих процессах трансформации органических соединений. Использование их в качестве биокатализаторов ацилирования может оказаться более оправданным по сравнению с препаратами ферментов, учитывая, с одной стороны, трудоемкость, высокие затраты материалов и энергии на концентрирование и выделение внеклеточных и внутриклеточных ферментов, а с другой стороны, значительный расход ферментов во время трансформации. Кроме того, важнейшим преимуществом интактных клеток перед ферментными препаратами может являться возможность их регенерации и многократного использования.

Известно, что проведение эффективного ацилирования, катализируемого ферментами в водной среде, невозможно, поскольку присутствие воды смещает равновесие липолитической реакции в сторону продуктов гидролиза. Поэтому реакцию проводят в органическом растворителе. В случае интактных клеток серьезным препятствием на пути катализа является цитоплазматическая мембрана, разделяющая двухфазную систему органический растворитель/вода внутри клетки. Одним из возможных вариантов, обеспечивающих доступность внутриклеточных ферментов субстрату и реагенту, находящихся, в органической среде, может быть обезвоживание поверхности клетки ацетоном.

В связи с этим особенно актуальной является задача поиска новых эффективных и стабильных биокатализаторов парциального ацилирования спиртов, обладающих широкой субстратной специфичностью и осуществляющих биотрансформацию субстрата с высоким выходом и оптической чистотой.

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.); научно-технической

программой «Научные исследования Высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники» 1998-2002 гг.

Цель работы. Разработка биокатализаторов энантиоселективного ацилирования рацемических спиртов на основе микроорганизмов, обладающих карбоксилэстеразной активностью, и создание методов получения оптически активных спиртов и эфиров.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

- скрининг микроорганизмов, обладающих высокой эстеразной активностью;
- разработка экспресс-метода скрининга микроорганизмов, синтезирующих ферменты, способные ацилировать спирты в органических растворителях;
- разработка энантиоселективных биокатализаторов парциального ацилирования спиртов на основе клеток микроорганизмов;
- исследование стабильности и условий эффективной работы биокатализаторов;
- разработка методов получения оптически активных спиртов и эфиров с использованием созданных биокатализаторов ацилирования;
- исследование синтетических возможностей полученных биокатализаторов.

Научная новизна. Найдены и идентифицированы новые штаммы *Pseudomonas* sp. 77-33, *Pseudomonas* sp. 77-47 и *Pseudomonas* sp. 59-3, на основе которых созданы стереоселективные биокатализаторы, эффективно катализирующие парциальное ацилирование рацемических спиртов. Разработаны научно обоснованные методы синтеза оптически активных спиртов и эфиров с использованием созданных биокатализаторов. Определены оптимальные параметры выращивания биомассы, найдены условия, в которых биокатализаторы проявляют наивысшую активность. Впервые предложен метод использования внутриклеточных ферментов для осуществления эффективного катализа реакций парциального ацилирования спиртов в неводных средах путем обезвоживания клеток ацетоном. Доказана повышенная стабильность и возможность многократного использования разработанных биокатализаторов.

Практическая значимость. Разработаны высокостереоселективные биокатализаторы на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1, *Pseudomonas* sp. 77-33, *Pseudomonas* sp. 77-47 и *Pseudomonas* sp. 59-3, эффективно катализирующие ацилирование спиртов. Созданы препаративные методы получения (S)-(+)-гептанола-2, (R)-(-)-гептанола-2, (S)-(+)-пентанола-2, (R)-(-)-пентанола-2, (R)-(-)-2,3-дихлорпропанола высокой оптической чистоты (97 – 100 %ее), которые являются оптически активными синтонами при получении различных низкомолекулярных биорегуляторов (феромонов насекомых, β -адренергетиков, цереброзидов, гормонов).

Методика разделения рацемических спиртов гептанола-2 и пентанола-2 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.); V Международной конференции по интенсификации нефтехимических процессов «Нефтехимия-99» (Нижнекамск, сентябрь 1999г.); XXXVII Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, апрель 1999 г.); конференции молодых ученых (Уфа, апрель 1999); Международной научно-практической конференции «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 г.); Всероссийской заочной конференции «Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях» (Тверь, 2002 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и тезисы 16 докладов.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы (1 глава), посвященный проблемам биокатализа в органической среде, описание объектов и методов исследования (2 глава), обсуждение результатов (3 глава), выводы и список цитируемой литературы, содержащей 159 ссылок. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит 17 рисунков и 36 таблиц.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Поиск микроорганизмов – потенциальных продуцентов энантиоселективных ацилирующих ферментов

Поиск микроорганизмов – потенциальных биокатализаторов – осуществляли среди липолитических штаммов музея кафедры биохимии и технологии микробиологических производств УГНТУ, а также выделенных из почвенных образцов, взятых с различных участков лесопарковой зоны г.

Уфы, нефтеперерабатывающих производств Республики Башкортостан и нефтепромыслов Сибири.

1.1. Скрининг микроорганизмов с эстеразной активностью

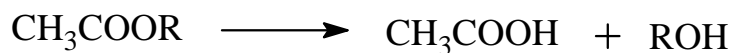
Выделение микроорганизмов, обладающих эстеразной активностью, осуществляли в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.

На первом этапе из накопительных культур микроорганизмов, ассимилирующих этилацетат, винилацетат и бутилацетат, были выделены 53 бактериальных штамма на селективной среде СР1, содержащей в качестве единственных источников углерода и энергии указанные эфиры.



Рис. 1. Схема скрининга микроорганизмов с эстеразной активностью: СР1 – минеральная среда, содержащая этилацетат, винилацетат и бутилацетат, температура 30 °С, концентрация субстрата 5 г/л, время реакции 5 ч.

Поскольку, липазы и эстеразы микроорганизмов в зависимости от созданных условий способны катализировать противоположные реакции гидролиза и ацилирования, вероятно, что штаммы, проявившие высокую гидролазную активность, могут также проявлять и высокую ацилирующую активность. В связи с этим на втором этапе в результате экспресс-тестирования выделенных из почвенных образцов и взятых из музея микроорганизмов было выявлено 86 штаммов, способных снижать pH среды в результате гидролиза этилацетата, бутилацетата и винилацетата.



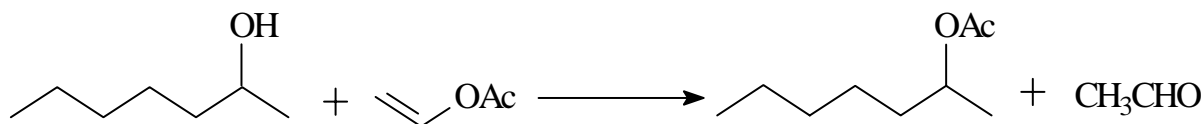
На следующем этапе скрининга была проведена количественная оценка гидролазной активности микроорганизмов. В результате этого были отобраны наиболее активные 50 штаммов, способные гидролизовать указанные эфиры со скоростями 1,0 – 2,0 г/(л·ч) и конверсией субстрата не менее 40 %.

1.2. Экспресс-метод исследования ацилирующей активности у микроорганизмов

Для выявления микроорганизмов, способных катализировать ацилирование спиртов, был разработан экспресс-метод тестирования, основанный на применении агаровых блоков с выросшими на них культурами микроорганизмов и позволяющий достаточно легко и без особых затрат на предварительную обработку тестировать микроорганизмы, имеющие ферменты, ответственные за ацилирование спирта, независимо от их локализации вне или внутри клетки.

Агаровые блоки формировали в стерильных условиях из агаризованной питательной среды (1 мл) в бюксах (10 мл). На поверхность агара высевали суспензию клеток тестируемого микроорганизма и инкубировали в течение 1-3 суток в зависимости от скорости роста штамма. Затем в бюкс вносили стандартную реакционную смесь и вновь инкубировали при той же температуре в течение 24 часов. По окончании реакции оценивали конверсию субстрата и выход продукта.

В результате тестирования из 50 штаммов, проявивших высокую гидролазную активность, были выявлены микроорганизмы, способные катализировать ацилирование гептанола-2 винилацетатом в органическом растворителе с конверсией выше 10 % с образованием втор-гептилацетата в течение 24 часов (табл. 1).



Использование в качестве доноров ацильной группы эфиров, на которых был произведен скрининг микроорганизмов, показало, что штаммы, выделенные на этилацетате и бутилацетате, проявляют слабую активность при ацилировании гептанола-2 этими же эфирами. В свою очередь, штаммы, выделенные на винилацетате, и липолитические микроорганизмы, выделенные

Таблица 1

Ацилирование гептанола-2 в гексане

Температура 30 °С, время реакции 24 часа, концентрация субстратов 10г/л.

Штамм	Ацилирующий агент	Конверсия, %	Штамм	Ацилирующий агент	Конверсия, %
1	2	3	4	5	6
57-1	бутилацетат	23,5	59-3	винилацетат	49,7
57-11	- // -	77,0	59-5	- // -	40,5
57-17	- // -	14,2	59-7	- // -	30,7
57-4	- // -	12,5	59-8	- // -	49,1
57-8	- // -	11,6	59-9	- // -	10,2
57-15	- // -	16,3	59-11	- // -	15,6
57-17	- // -	14,2	77-33	- // -	43,1
57-18	- // -	29	77-47	- // -	49,6
58-3	этилацетат	12,3	77-39	- // -	40
58-8	- // -	20,7	79-10	- // -	17,4
58-13	- // -	13,2	<i>Bacillus</i> sp. 77-1*	- // -	49,4
58-15	- // -	14,1	79-14	- // -	10,2
59-1	винилацетат	49,8	79-50	- // -	22
59-2	- // -	47			

Примечание: * - музейный штамм УГНТУ

на оливковом масле, лучше всего катализировали ацилирование спирта винилацетатом (см. табл. 1).

1.3 Исследование ацилирования гептанола-2 в условиях экспресс-теста

С целью выявления микроорганизмов - потенциальных продуцентов стереоселективных ферментов, ацилирующих вторичные спирты, была исследовано ацилирование гептанола-2 для наиболее активных штаммов, которые ацилируют спирт не менее чем на 40 %. Было установлено, что только штаммы 77-33, 77-47, *Bacillus* sp. 77-1, 77-39, 59-1, 59-2, 59-3 и 59-8 проявляют кинетику типичную для высокостереоселективного процесса разделения рацемических соединений. Эти микроорганизмы конвертировали половину рацемического субстрата к 28 - 52 ч, после чего глубина превращения сохранялась на достигнутом уровне.

Исследование зависимости глубины превращения гептанола-2 от его начальной концентрации показало, что его конверсия не зависит от количества вносимого в реакционную смесь субстрата (табл. 2), Это свидетельствует в пользу наличия стереоселективных ферментов у этих микроорганизмов.

**Конверсия гептанола-2 при различных начальных
концентрациях субстрата (S_0)**

Температура 30 °С, время реакции 60 часов

Штамм	Конверсия гептанола-2, %			
	$S_0=5$ г/л		$S_0=10$ г/л	
	30 ч.	60 ч.	30 ч.	60 ч.
77-33	49,6	50	50	49
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	49	49,5	51	50
77-47	50	50	51,3	51
59-1	50	49,7	50	50,5
59-2	48,2	49	49	49
59-3	51	50,5	50	49,6
59-8	49	50	50	50

Выращивание микроорганизмов осуществляли на минеральном фоне с винилацетатом в течение 3-х суток, а штамм *Bacillus* sp. 77-1 в течение 1 суток (Коновалов А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. // БХЖ. – 2000).

2. Исследование влияния состава среды на ацилирующую активность перспективных микроорганизмов

Было проведено исследование влияния состава различных наиболее доступных сред на ацилирующую активность и рост микроорганизмов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние состава среды на рост и активность микроорганизмов

Температура инкубирования 30°С, температура реакции 30 °С, время реакции 24 часа, концентрация субстрата 10 г/л

Штамм	Рост*			Ацилирующая активность, г/л·ч		
	СР-1	СР-2	СР-3	СР-1	СР-2	СР-3
77-33	1	2	3	0,77	1,4	1,35
77-47	1	2	3	0,82	1,61	1,54
59-1	1	2	3	0,41	0,87	0,9
59-2	1	2	3	0,28	0,75	0,77
59-3	1	2	3	0,79	1,7	1,65
59-8	1	2	3	0,17	0,58	0,53
57-11	1	2	3	0,88	1,8	1,85

Примечание: СР-1 – минеральная среда с винилацетатом, СР-2 – минеральная среда с винилацетатом, обогащенная дрожжевым автолизатом (200 мг/л) и пептоном (200 мг/л), СР-3 – сусло; * - рост микроорганизмов оценивали в баллах (0 – отсутствие роста, 1 – слабый рост, 2 – хороший рост, 3 – обильный рост)

Полученные результаты (см. табл. 3) показывают, что на средах СР3 (агаризованное сусло) и СР2 (минеральный фон с винилацетатом, обогащенный дрожжевым автолизатом и пептоном) наблюдался наибольший рост биомассы, в свою очередь, активность ферментов у всех микроорганизмов, выращенных на (СР-2) и агаризованном сусле (СР-3), в катализируемой

реакции практически не изменяется, а при выращивании на среде СР1 (минеральный фон с винилацетатом) было отмечено существенное снижение ацилирующей активности. Это предполагает возможность использования в качестве ростового субстрата широкого круга доступных веществ, обеспечивающих высокую скорость роста микроорганизмов.

3. Разработка биокатализаторов ацилирования на основе клеток микроорганизмов

В результате исследования кинетики ацилирования гептанола-2 было установлено, что синтез эфира в условиях экспресс-метода происходит медленно, что ограничивает его использование для получения гептанола-2 в препаративных целях. Основным ограничением скорости синтеза является небольшое количество катализатора, вносимого в реакционную смесь в составе агарового блока, в связи с этим для интенсификации процесса необходимо было разработать способ внесения гораздо больших количеств биокатализатора.

Однако может существовать и другая причина отсутствия активности сырой биомассы – это малая поверхность контакта клеток с органическим растворителем, поскольку при перемешивании биомасса скатывается в крупные гранулы, что затрудняет массообменные процессы. Кроме того, наличие липидного бислоя вокруг клетки также может препятствовать проникновению субстрата в клетку и взаимодействию с ним внутриклеточных ферментов.

3.1. Исследование влияния обезвоживания биомассы ацетоном на ее гидролазную и ацилирующую активность

Было проведено сравнение активности биомассы, предварительно обезвоженной обработкой ацетоном, и необработанной биомассы при гидролизе сложных эфиров уксусной кислоты и ацилировании гептанола-2 винилацетатом (табл. 4).

Таблица 4

Активность ацетоновых порошков при гидролизе этилацетата, бутилацетата и винилацетата и ацилировании гептанола-2

Температура 30 °С, концентрация субстрата 10 г/л, время реакции 24 часа

Штамм	Гидролазная активность, г/л·ч		Ацилирующая активность, г/л·ч
	Необработанная биомасса	Обработанная биомасса	Обработанная биомасса
77-1	1,8	1,9	2,1
77-33	1,5	1,65	2,05
77-47	1,5	1,5	1,95
59-1	1,1	1,23	1,4
59-2	1,3	1,35	1,2
59-3	1,1	1,27	2,07
59-8	0,3	0,45	0,75

В результате этого выяснилось, что обезвоживание клеток микроорганизмов ацетоном не только увеличивает скорость гидролиза указанных эфиров, но также позволяет эффективно проводить ацилирование гептанола-2 (см. табл. 4), что может быть использовано для катализа реакций парциального ацилирования рацемических спиртов в органических средах.

3.2. Принципиальная схема получения биокатализаторов парциального ацилирования спиртов

Была предложена принципиальная схема производства биокатализаторов ацилирования спиртов на основе выделенных штаммов (рис. 2), которая включает в себя выращивание культур микроорганизмов глубинным способом в ферментере 1 на сусле в течение 3 дней ($pH_{нач.}=7,0$, $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Далее выращенная биомасса отделяется от культуральной жидкости центрифугированием, отмывается фосфатным $0,05\text{ M}$ буфером $pH\ 7,0$ от остатков среды (емкость 3), отфуговывается на центрифуге 4 и обрабатывается ацетоном (ацетон : биомасса 3:1) в емкости 5. Обработанная биомасса освобождается от ацетона на центрифуге 6 и сушится при комнатной температуре.

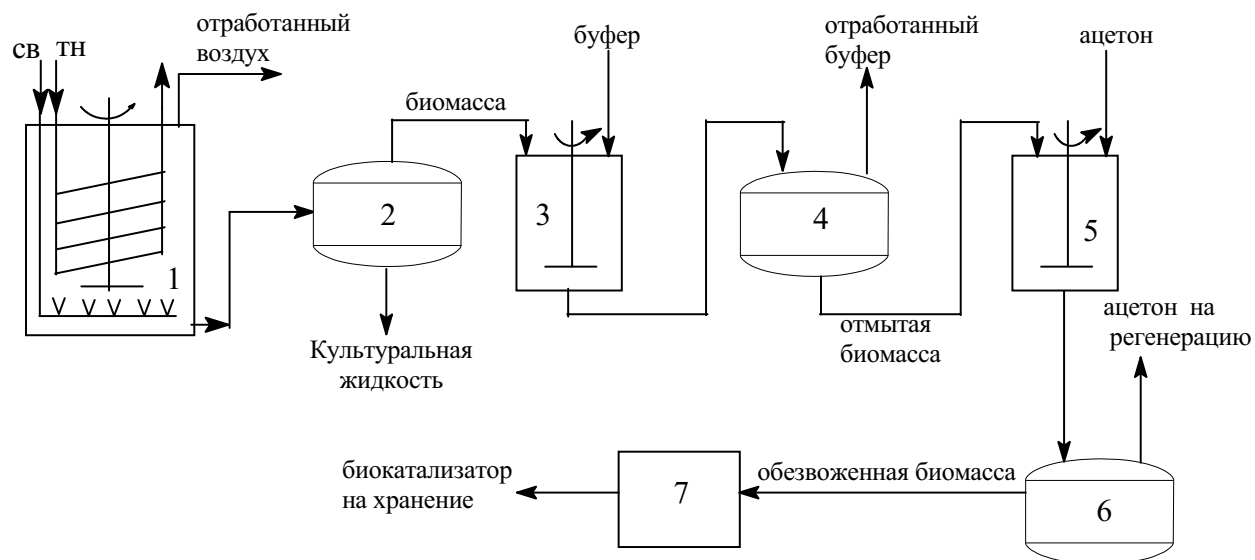


Рис. 2. Принципиальная схема получения биокатализаторов парциального ацилирования спиртов:

1 – ферментер глубинного культивирования; 3,5 – емкости, 2,4,6 – центрифуги; 7 – вакуумно-сушильный шкаф; СВ – стерильный воздух; ТН - теплоноситель

Использование предложенной схемы позволяет получать 5 – 7 г биокатализатора в виде обезвоженной биомассы с 1 литра жидкой среды (сусла).

4. Исследование стабильности биокатализатора при длительном хранении

Сохранение активности при длительном хранении является одним из основных требований, предъявляемых к биокатализаторам при их использовании в промышленных масштабах. В связи с этим было проведено исследование стабильности биокатализатора при хранении как в виде необработан-

ной отфугованной биомассы, так и в виде обработанной ацетоном биомассы в течение 9 месяцев при температуре -15°C .

Таблица 5

Зависимость ацилирующей активности замороженной сырой биомассы и обезвоженных клеток от длительности хранения

Температура реакции 30°C , время реакции 24 часа, концентрация субстрата 10 г/л

Штаммы	Ацилирующая активность клеток, *%							
	Хранение в виде замороженной биомассы				Хранение в виде ацетонового порошка			
	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев
77-47	100	95	60	25	100	110	100	99
77-33	100	102	75	30	100	101	98	99
77-1	100	-	-	35	100	100	99	102
59-1	100	87	70	20	100	101	102	100
59-2	100	90	50	10	100	99	100	98
59-3	100	92	65	40	100	100	99	98
59-8	100	-	-	30	100	104	101	100

Примечание: * за 100 % принята активность свежей биомассы и ацетонового порошка

В результате этого было установлено, что обработанная ацетоном биомасса является более стабильной по сравнению с необработанной и дольше сохраняет свою активность (табл. 5).

Таким образом, обработка биомассы ацетоном повышает стабильность биокатализатора, не снижая при этом её активности. Кроме того, подобная обработка позволяет увеличить скорость реакции, так как в результате обработки клеток ацетоном повышается проницаемость их клеточной мембраны, вследствие чего субстрат становится более доступным внутриклеточным ферментам. Все это позволяет более эффективно использовать выделенные микроорганизмы в качестве биокатализаторов в процессах ацилирования вторичных спиртов в органическом растворителе.

5. Исследование условий ацилирования гептанола-2 обезвоженными клетками

На селективность процесса и выход продукта существенное влияние может оказывать как вид органического растворителя, так и природа ацилирующего агента. В свою очередь, температура реакции также оказывает значительное влияние на активность биокатализаторов. В связи с этим было проведено исследование влияния этих факторов на ацилирование гептанола-2 винилацетатом в присутствии клеток микроорганизмов, прошедших предварительную обработку ацетоном с целью повышения эффективности трансформации гептанола-2.

5.1. Исследование влияния температуры на ацилирование гептанола-2

Изменение ацилирующей активности биокатализаторов при различных температурах в процессе ацилирования гептанола-2 винилацетатом в гексане представлено на рис. 3.

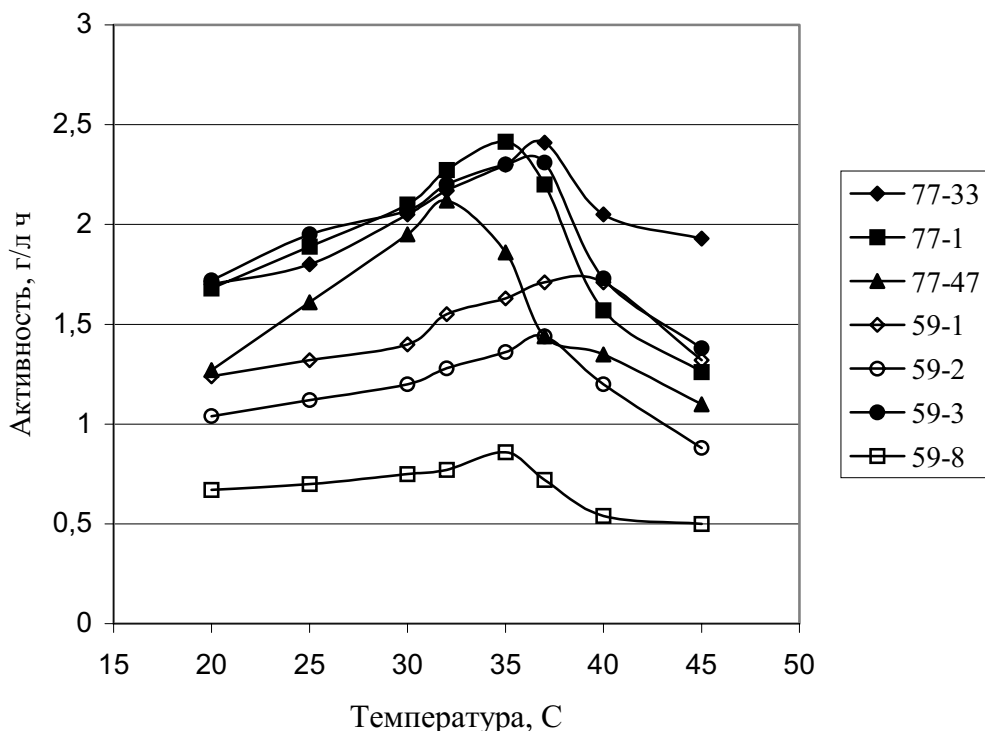


Рис. 3. Влияние температуры на активность биокатализаторов парциального ацилирования спиртов

Концентрация субстратов 10 г/л, время реакции 24 ч.

Максимальная активность у большинства разработанных биокатализаторов с 50% конверсией субстрата достигается при 35 – 37 °С, а штаммы 77-47 и 59-1 проявляют максимальную активность при 32 и 40 °С соответственно.

5.2. Влияние природы органического растворителя на ацилирование гептанола-2

Несмотря на то, что большинство ферментов хорошо работают в различных органических растворителях (Клибанов, 1986; Gray, 1990), тип растворителя может оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на активность и стабильность разрабатываемых биокатализаторов. Охарактеризовать полярность растворителя можно при помощи значения относительного коэффициента Log P (Клибанов, 1989; Laane, 1987). В общем случае в растворителях с величиной Log P < 2.0 проявляется слабая биокаталитическая активность, а в растворителях с величиной Log P > 4 – высокая активность.

В табл. 6 показано влияние различных органических растворителей на процесс ацилирования гептанола-2.

Таблица 6

**Влияние природы органического растворителя
на ацилирование гептанола-2**

Температура 30 °С, время реакции 24 ч, концентрация субстратов 10г/л, концентрация обезвоженной биомассы 30 г/л

Растворители	Log P	Конверсия гептанола-2, %						
		77-33	77-47	77-1	59-1	59-2	59-3	59-8
Изооктан	4,5	50	51	50	50	49	50	50
Гептан	4,0	50	50	50	49	50	51	50
Гексан	3,5	50	50	50	48,9	49,7	50	50
Пентан	3,0	49	50	51	50	50	50	50
Толуол	2,5	32	40	23	30	18	12	20
Бензол	2,0	37	33	12	28	15	10	25
Хлороформ	2,0	21	10	12	25	5	13	7
Тетрагидрофуран	0,49	2,5	4	1,7	0	0	3	0
Ацетон	-0,23	0	0	0	0	0	0	0
Ацетонитрил	-0,33	0	0	0	0	0	0	0
Диэтиловый эфир		0	0	0	0	0	0	0

В таких растворителях, как изооктан, гексан, гептан, пентан с величиной $\text{Log P} > 3.0$, наблюдалась высокая конверсия субстрата, в то время как в хлороформе, бензоле и толуоле конверсия гептанола-2 снижалась, а в растворителях с величиной $\text{Log P} < 2.0$ активность биокатализаторов практически отсутствовала.

5.3. Влияние строения ацилирующего агента на трансформацию гептанола-2

Исследование влияния природы донора ацильной группы на трансформацию гептанола-2 в гексане клетками, обработанными ацетоном, показало, что наиболее подходящим донором является винилацетат, с которым все штаммы конвертировали спирт на 49- 50 %.

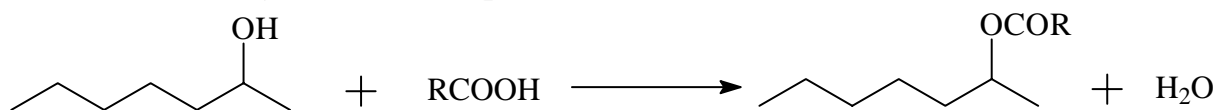
Таблица 7

**Влияние природы ацилирующего агента на трансформацию
гептанола-2**

Температура 30 °С, время реакции 24 ч, концентрация субстратов 10 г/л, концентрация обезвоженной биомассы 30 г/л

Доноры ацильной группы	Конверсия, %						
	77-1	77-33	77-47	59-1	59-2	59-3	59-8
Винилацетат	49	49,6	50	50	48,2	51	49
Бутилацетат	10,5	1,4	4,7	6,7	7,8	5	6
Этилацетат	9	2,1	1,5	4	6	3,4	4,3
Уксусная кислота	3	0	4	7	5,5	3	5
Изомасляная к-та	11,5	19	13	18	10	8	21
Валериановая к-та	7,2	15	14	4	13	11	22
Олеиновая к-та	10	0	5	19,5	15	11,5	25,7

Исследование этерификации гептанола-2 такими органическими кислотами, как олеиновая, валериановая, изомасляная и уксусная, показало, что практически все исследуемые штаммы способны катализировать этерификацию гептанола-2 указанными органическими кислотами.



где R: CH_3 , C_4H_9 , C_5H_{11} , C_9H_{19} , $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$

Однако все штаммы показали довольно низкую степень превращения гептанола-2 (Табл. 7). Использование водного адсорбента – цеолита 4⁰А с целью удаления образующейся в результате реакции воды не привело к существенному увеличению конверсии спирта.

6. Исследование стабильности биокатализаторов в процессе ацилирования

С целью оценки стабильности разрабатываемого биокатализатора была исследована способность биомассы, отработавшей один цикл ацилирования, осуществлять повторные трансформации субстрата, вносимого каждый раз в первоначальной концентрации.

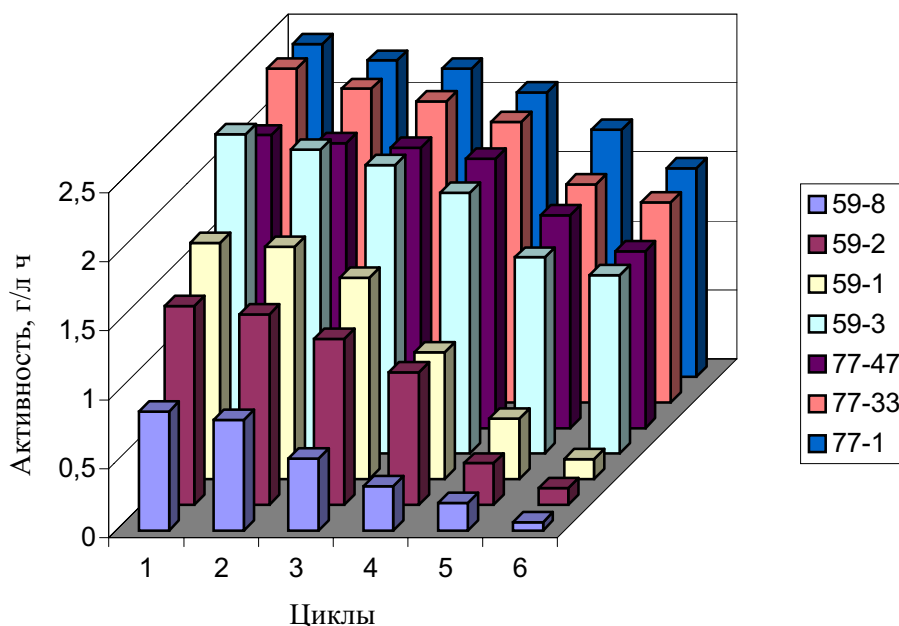


Рис. 4. Скорость ацилирования гептанола-2 ацетоновыми порошками в течение 6 циклов

Температура 30 °С, время реакции 24 часа, концентрация субстратов 10г/л, концентрация обезвоженной биомассы 30 г/л

Установлено, что все биокатализаторы проявляют способность катализировать ацилирование гептанола-2 в течение 6 циклов с достижением 50 % конверсии спирта (рис. 4). Однако скорость ацилирования гептанола-2 к 6 циклу начинает снижаться у всех микроорганизмов, особенно у штаммов 59-1, 59-2 и 59-8. Возможно, это происходит из-за постепенной инактивации

1, 59-2 и 59-8. Возможно, это происходит из-за постепенной инактивации ацилирующих ферментов под действием как органического растворителя (гексана), так и образующихся продуктов реакции.

Таким образом, наиболее перспективными штаммами, катализирующими парциальное ацилирование спиртов, являются штаммы 77-33, 77-47, 59-3 и *Vacillus sp.* 77-1, обладающие большей активностью и стабильностью при многократном использовании, по сравнению со штаммами 59-1, 59-2 и 59-8.

7. Идентификация микроорганизмов и исследование патогенных свойств

С целью идентификации полученных в результате скрининга наиболее активных штаммов были изучены их основные морфологические и физиолого-биохимические свойства. Данные исследования показали, что отобранные штаммы 77-33, 77-47 и 59-3 наиболее близки по описанию к бактериям рода *Pseudomonas sp.*

Испытания штаммов на патогенность, выполненные сотрудниками Института экологии труда и гигиены человека, показали, что они не обладают патогенными для человека и животных свойствами.

8. Разработка метода кинетического разделения гептанола-2

При разработке метода кинетического разделения гептанола-2 была использована принципиальная схема, представленная на рис. 5, которая включает в себя: трансформацию субстрата в реакторе 1, куда помещается растворитель – гексан, в котором растворяется субстрат и винилацетат, последний берется с избытком 10-15 %. Биокатализатор добавляется из расчета 30 г/л. Реакция проводится в течение 8 часов при 32-37 °С. После завершения реакции биокатализатор отделяется от реакционной среды центрифугирова-

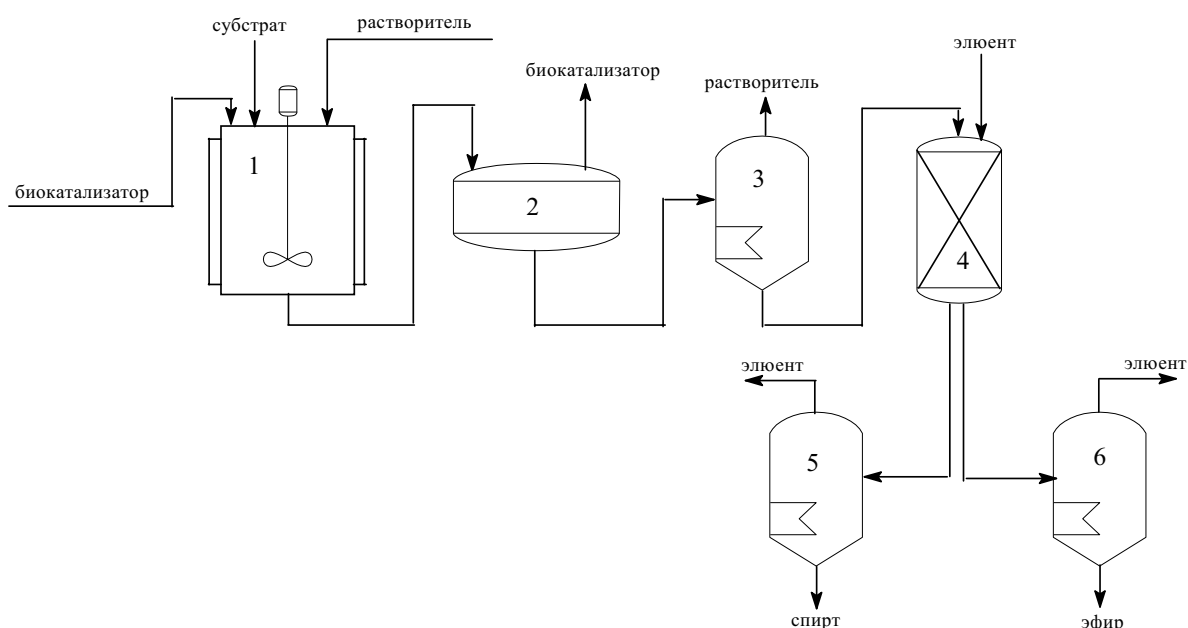


Рис. 5. Принципиальная схема получения (S)-гептанола-2

Условные обозначения: 1 – реактор, 2 – центрифуга, 3,5,6 – вакуумный испаритель, 4 – колонка ВЭЖХ

нием 2. Реакционная смесь упаривается на вакуумно-роторном испарителе 3. Разделение спиртовой и эфирной фракций осуществляется методом ВЭЖХ (элюэнт гексан:этилацетат 1:1) 4. Фракции, содержащие спирт и эфир, упариваются под вакуумом 5 и 6.

По приведенной схеме был разработан метод получения оптически активных (S)-(+)-гептанола-2 и (R)-(-)-гептанола-2, которые являются важнейшими оптически активными синтонами.

Оптически активный (S)-(+)-гептанол-2 был получен в реакциях, катализируемых биокатализаторами, разработанными на основе штаммов *Pseudomonas* sp. 77-33 и *Pseudomonas* sp. 77-47, а оптически активный (R)-(-)-гептанол-2 - в реакции, катализируемой биокатализаторами, разработанными на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Pseudomonas* sp. 59-3. Выход продуктов трансформации и оптическая чистота показаны в табл. 8.

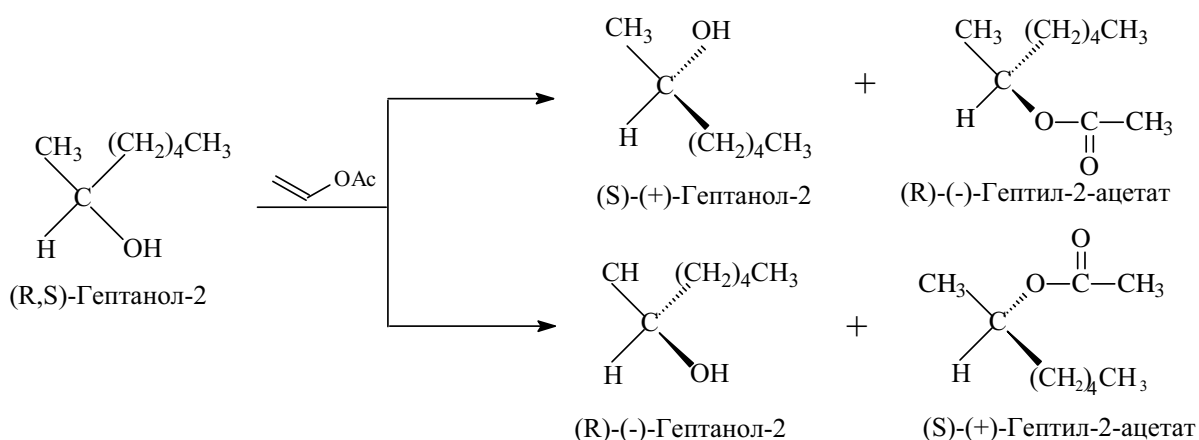


Таблица 8

Выход продуктов ацилирования гептанола-2 винилацетатом

Биокатализатор – 30 г/л; субстрат – 10 г/л за 1 цикл; количество циклов – 6.

Биокатализатор	Оптически активный гептанол-2			Оптически активный гептил-2-ацетат		
	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	50	40	97	48	45	94
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-33	49	46	99	50	42	97
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-47	48	45	96	50	45	95
<i>Pseudomonas</i> sp. 59-3	50	43	98	49	44	97

В результате использования разработанного метода оптически активные гептанол-2 и гептил-2-ацетат образуются с выходом 48-50%, что составляет 96-100 % от теоретически возможного по соответствующему изомеру. С учетом выделения чистых продуктов выход составил 40-46 %.

9. Исследование субстратной специфичности биокатализаторов

Исследование субстратной специфичности разрабатываемых биокатализаторов в стандартных условиях показало, что они проявляют достаточно широкую специфичность как к различным спиртам, так и к некоторым азотсодержащим соединениям (Табл. 9).

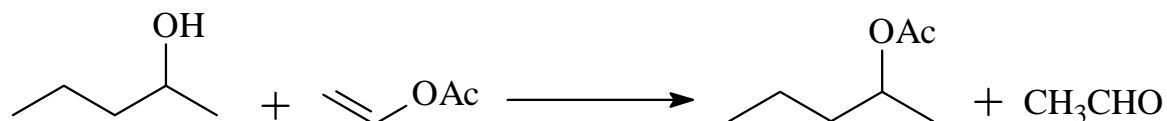
Таблица 9

Исследование субстратной специфичности в стандартных условиях

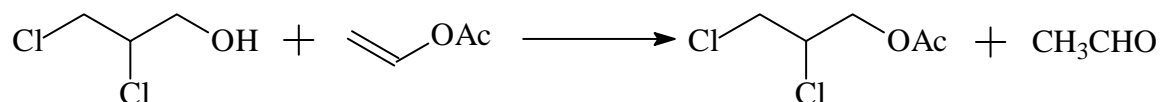
Температура 30 °С, концентрация биомассы 30 г/л, концентрация субстратов 10 г/л

Субстрат	Конверсия, %						
	77-1	77-33	77-47	59-1	59-2	59-3	59-8
Спирты							
пентанол-2	50	49,2	47	50	51	50	50
2,3-дихлорпропанол	42,2	80	30	20	100	63,5	25
гераниол	65	78	87	80	76	67	80
глицерин	0	0	0	0	0	0	0
Азотсодержащие субстраты							
2-аминобутан	30,4	51	28,4	32,2	40,9	50	34
оксим бутанона-2	1,1	50	6,8	9,5	5,8	48,9	12,4
N-3E-пент-2-ил-ортолуэдина	100	0	0	0	0	0	0

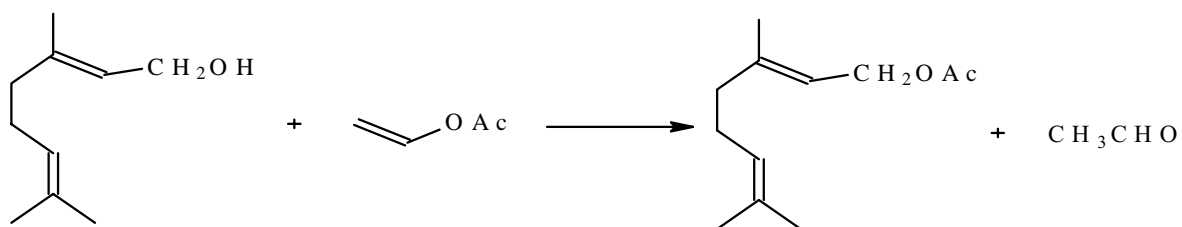
Так, ацилирование пентанола-2, катализируемое разработанными биокатализаторами, приводит к образованию пентил-2-ацетата, причем все штаммы трансформируют спирт со степенью превращения ~50 % и могут рассматриваться как потенциальные энантиоселективные биокатализаторы.



В случае ацилирования 2,3-дихлорпропан-1-ола было обнаружено, что штамм *Vacillus* sp. 77-1 способен трансформировать данное соединение с конверсией, близкой к 50 % уровню.

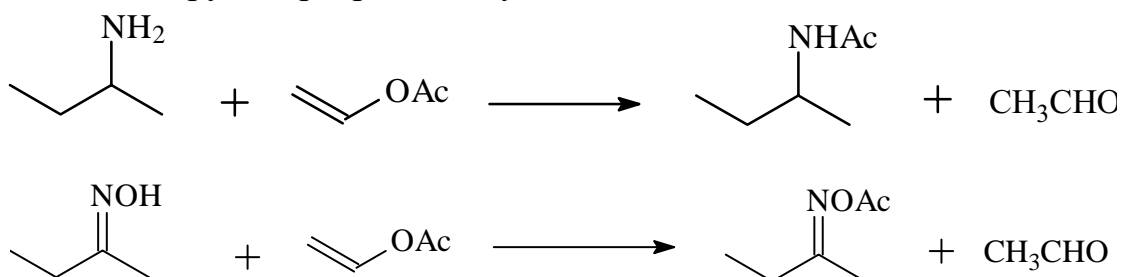


Практически все исследуемые штаммы ацилировали гераниол с образованием геранилацетата, причем в изооктане конверсия указанного спирта достигала 90-95%.

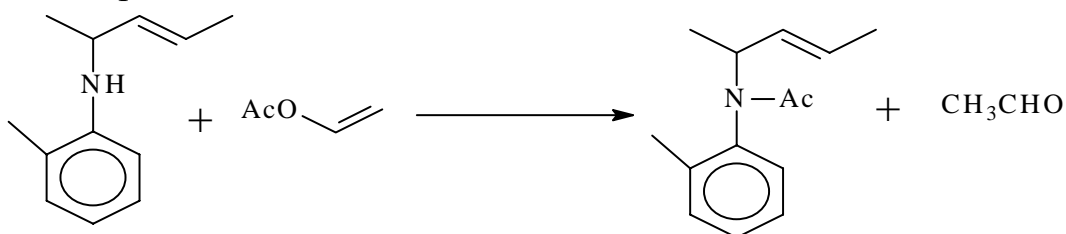


При проведении этерификации глицерина бензойной кислотой и метиловым эфиром олеиновой кислоты выяснилось, что исследуемые штаммы не катализируют данную реакцию.

Применение разработанных биокатализаторов в процессах ацилирования таких азотсодержащих соединений, как 2-аминобутан и оксим бутанона-2, показало, что штаммы *Pseudomonas* sp. 77-33 и *Pseudomonas* sp. 59-3 успешно катализируют превращение указанных соединений.



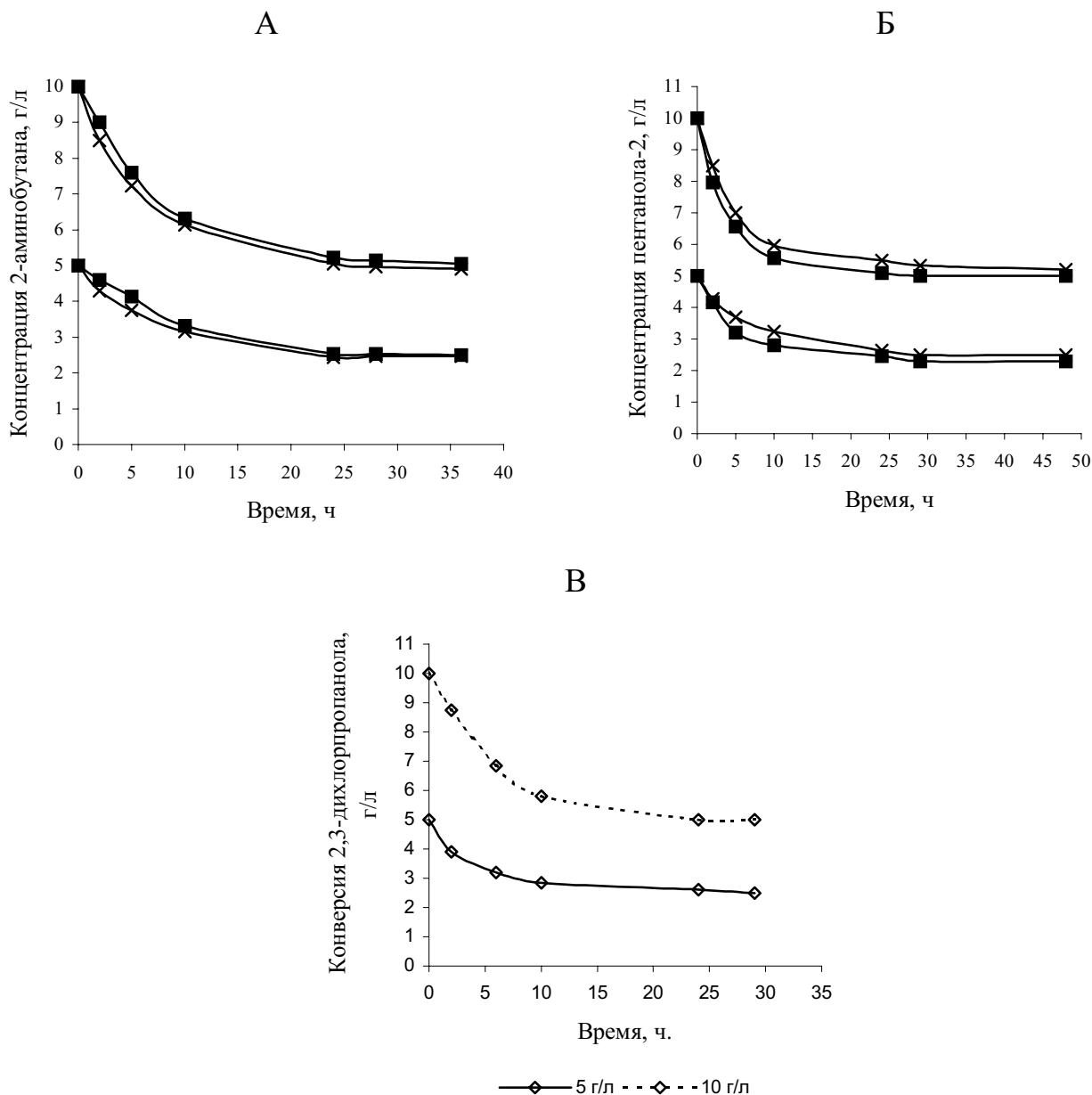
Исследование трансформации N-3E-пентен-2-ил-ортотолуидина показало, что из всех штаммов только штамм *Bacillus* sp. 77-1 способен катализировать ацилирование данного соединения.



9.1. Исследование кинетики ацилирования хиральных субстратов

Исследование кинетики ацилирования винилацетатом хиральных субстратов позволило выявить потенциальные энантиоселективные биокатализаторы процессов кинетического разделения рацемических 2-аминобутана (рис. 6,А), пентанола-2 (рис. 6,Б) и 2,3-дихлорпропанола (рис. 6,В).

Изучение процесса ацилирования 2-аминобутана показало наличие активности у двух штаммов *Pseudomonas* sp. 77-33 и *Pseudomonas* sp. 59-3. Причем, как видно из рис. 6, оба штамма проявили кинетику, характерную для стереоселективного процесса, они конвертировали субстрат на 50 %, после чего конверсия субстрата не менялась. Конверсия 2-аминобутана также не зависит от начальной концентрации субстрата, что может указывать на наличие стереоселективных свойств у этих микроорганизмов (см. рис. 6). Аналогичными свойствами данные штаммы обладают по отношению к пентанола-2, а штамм *Bacillus* sp. 77-1 к 2,3-дихлорпропан-1-олу, конвертируя субстрат на 50 %.



Pseudomonas sp. 77-33,

Pseudomonas sp. 59-3,

Bacillus sp. 77-1

Рис. 6. Трансформация хиральных субстратов разработанными биокатализаторами:

А - кинетика ацилирования 2-аминобутана, Б - кинетика ацилирования пентанола-2,

В - кинетика ацилирования 2,3-дихлорпропанола штаммом *Bacillus* sp. 77-1

Время реакции 29-50 часов, температура 30 °С, концентрация субстратов 10 г/л

10. Разработка препаративных методов получения практически ценных веществ

10.1. Получение оптически активного пентанола-2

С использованием схемы, представленной на рис. 5, был разработан метод получения (S)-(+)-пентанола-2 и (R)-(-)-пентанола-2, которые являются важнейшим оптически активным синтоном, на базе которого может быть синтезирован эффективный экологически безопасный инсектицид – половой феромон жука-точильщика *Nediprion lecontei*.

Оптически активный (S)-(+)-пентанол-2 был получен в реакциях, катализируемых биокатализаторами на основе штаммов *Pseudomonas* sp. 77-33 и *Pseudomonas* sp. 77-47, а оптически активный (R)-(-)-пентанол-2 – в реакциях, катализируемых биокатализаторами на основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1 и *Pseudomonas* sp. 59-3 (табл. 10):

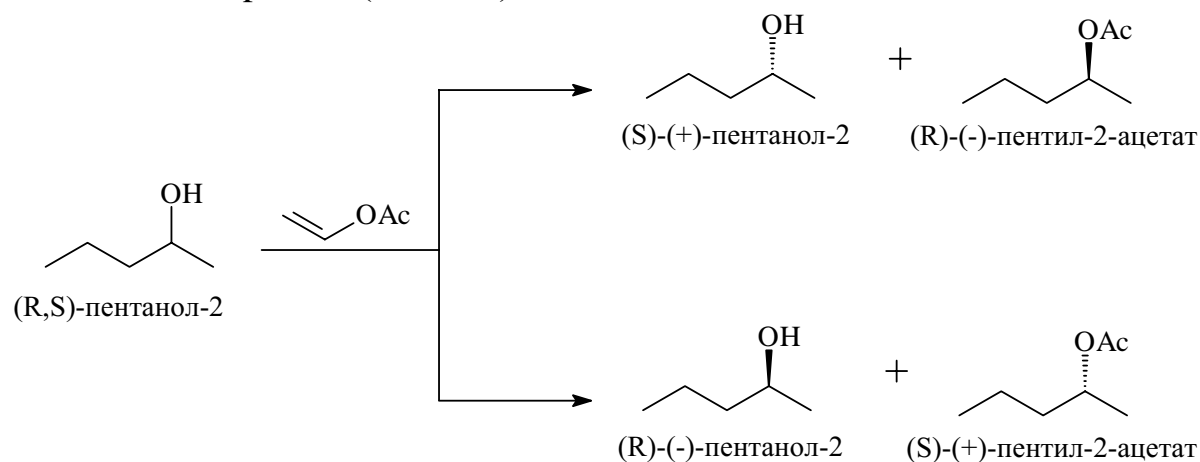


Таблица 10

Выход продуктов ацилирования пентанола-2 винилацетатом

Биокатализатор – 30 г/л; субстрат – 10 г/л за 1 цикл; количество циклов – 6.

Биокатализатор	Оптически активный пентанол-2			Оптически активный пентанол-2-ацетат		
	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	49	43	99	50	40	96
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-33	50	45	100	50	46	98
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-47	49	40	97	48	42	92
<i>Pseudomonas</i> sp. 59-3	48	42	98	49	40	97

В результате использования разработанного метода оптически активные пентанол-2 и пентил-2-ацетат образуются с выходом 48-50%, что составляет 96-100 % от теоретически возможного по соответствующему изомеру. С учетом выделения чистых продуктов выход составил 40-45 %.

10.2. Кинетическое разделение 2,3-дихлорпропанола

Оптические изомеры 2,3-дихлорпропанола являются важнейшими синтонами для получения лекарств (β -блокаторы), витаминов, феромонов насекомых, а также ферроэлектрических кристаллов. В связи с этим с использованием биокатализатора на основе штамма *Bacillus* sp. 77-1 был разработан

метод получения оптически активного (R)-(-)-2,3-дихлорпропанола высокой оптической чистоты (табл. 11).

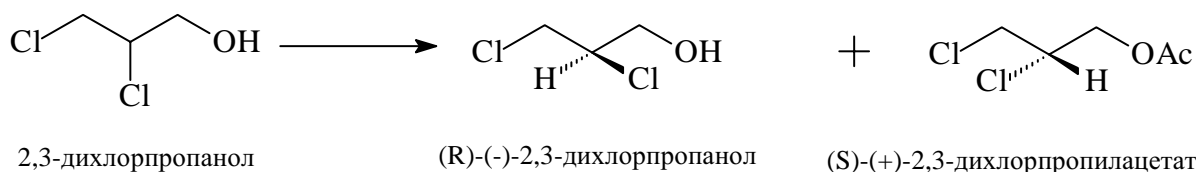


Таблица 11

Результаты ацилирования рацемического 2,3-дихлорпропанола винацетатом

Биокатализатор – 30 г/л; субстрат – 10 г/л за 1 цикл; количество циклов – 6.

Штамм	(R)-(-)-2,3-дихлорпропанол			(S)-(+)-2,3-дихлорпропилацетат		
	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee	Выход после трансформации, %	Выход с учетом выделения, %	Оптическая чистота, % ee
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	50	43	97	49	45	94

10.3. Синтез геранилацетата

Различные эфиры гераниола широко применяются в косметической промышленности для получения различных отдушек и ароматических добавок. В связи с этим был разработан метод синтеза геранилацетата этерификацией гераниола винацетатом в гексане в присутствии разработанных биокатализаторов (табл. 12).

Таблица 12

Результаты этерификации гераниола

Биокатализатор – 30 г/л; субстрат – 10 г/л за 1 цикл; количество циклов – 6.

Биокатализатор	Конверсия гераниола, %	Выход геранилацетата, %
<i>Bacillus</i> sp. 77-1	91	90
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-33	98	95
<i>Pseudomonas</i> sp. 77-47	87	89
<i>Pseudomonas</i> sp. 59-3	88	90

Биокатализаторы на основе штаммов *Pseudomonas* sp. 77-33, 77-47, 59-3 и *Bacillus* sp. 77-1 катализируют образование геранилацетата в течение 48 часов с выходом 90-95 %.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга из природных источников выделены и идентифицированы микроорганизмы *Pseudomonas* sp. 77-33, 77-47 и 59-3, обладающие высокой эстеразной активностью.

2. Разработан экспресс-метод скрининга микроорганизмов, синтезирующих ферменты, катализирующие ацилирование спиртов в органическом растворителе, который основан на использовании агаровых блоков с выросшими на них культурами микроорганизмов.

3. На основе штаммов *Bacillus* sp. 77-1, *Pseudomonas* sp. 77-33, *Pseudomonas* sp. 77-47 и *Pseudomonas* sp. 59-3 разработаны энантиоселективные биокатализаторы парциального ацилирования спиртов. Установлено влияние параметров роста биомассы и трансформации на активность биокатализаторов, влияние условий хранения на их стабильность. Показана возможность многократного применения созданных биокатализаторов в течение длительного времени.

4. Предложена принципиальная технологическая схема получения энантиоселективных биокатализаторов парциального ацилирования спиртов.

5. Разработаны методы разделения рацемических гептанола-2 и пентанола-2 путем их парциального ацилирования винилацетатом, позволяющие получать с высокими (70 – 80 %) выходами (S)-(+)-гептанол-2, (R)-(-)-гептанол-2 и (S)-(+)-пентанол-2, (R)-(-)-пентанол-2 высокой оптической чистоты (97-100 % ee).

6. Разработан метод парциального ацилирования рацемического 2,3-дихлорпропанола, позволяющий получать (R)-(-)-2,3-дихлорпропанол высокой оптической чистоты (97 % ee).

7. Разработан биокаталитический метод ацилирования гераниола в мягких условиях, позволяющий получать геранилацетат с высоким выходом (95 %).

8. На основе проведенных исследований научно обоснована принципиальная технологическая схема получения оптически активных синтонов низкомолекулярных биорегуляторов и душистых веществ: (S)-(+)-гептанола-2, (R)-(-)-гептанола-2, (S)-(+)-пентанола-2, (R)-(-)-пентанола-2, (R)-(-)-2,3-дихлорпропанола и гераниолацетата.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Петухова Н.И., Коновалов А.А., Мубараков А.И., Зорин В. В. Поиск микроорганизмов - продуцентов липолитических ферментов // Матер. 49 науч.-техн. конф. студ., асп. и молод. уч. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 1998. - С. 156.
2. Петухова Н.И., Коновалов А.А., 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: Изд-во УГНТУ, 1998. - С. 31.
3. Мубараков А.И., Коновалов А.А., Меленберг С.В., Байракова Л.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Поиск микроорганизмов, являющихся биокатализаторами в процессах разделения рацемических смесей энантиомеров вторич-

ных спиртов // Матер. XXXVII Междунар. науч. студ. конф. – Новосибирск, 1999. - С. 134.

4. Мубараков А.И., Карышев А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг микроорганизмов для ацилирования вторичных спиртов в органических растворителях // Матер. XXXVIII Междунар. науч. студ. конф. – Новосибирск, 2000. - С. 109-110.

5. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Микробиологическое ацилирование вторичных спиртов // «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины»: Матер. конф. – Уфа, 1999. - С 31.

6. Карышев А.А., Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Интенсификация процесса разделения эфиров вторичных спиртов // Матер. 51 науч.-техн. конф. студ., асп. и молод. уч. – Уфа: Изд.-во. УГНТУ, 2000. - С. 111.

7. Мубараков А.И., Меленберг С.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Интенсификация процесса ацилирования вторичных спиртов липазами микроорганизмов. // Реактив-99: Матер. XII Междунар. конф. по произв. и примен. хим. реакт. и реаг. – Уфа-М., 1999. - С. 72-73.

8. Мубараков А.И., Меленберг С.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Исследование ацилирования вторичных спиртов клетками микроорганизмов в органическом растворителе // Сервис большого города: Междунар. науч.-практ. конф. – Уфа, 1999. - С. 45.

9. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Гареев В.М., Зорин В.В. Поиск новых микробных биокатализаторов для энантиоселективного ацилирования гептанола-2 // БЖХ. – 2000. - Т. 7. –№5. – С. 37-39.

10. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Ацилирование вторичных спиртов в органическом растворителе с помощью клеток микроорганизмов // Биотехнология в ФЦП «Интеграция»: Матер. заоч. науч.-практ. конф. – СПб, 1999. - С. 55.

11. Мубараков А.И., Карышев А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Парциальное ацилирование вторичных спиртов при помощи микроорганизмов // Актуальные тенденции в органическом синтезе на пороге новой эры: Материалы второй международной конференции молодых ученых. – Санкт-Петербург, Изд. С.-ПбГУ, - 1999, с. 75;

12. Мубараков А.И., Коновалов А.А., Меленберг С.В., Петухова Н.И., Зорин В.В. Разделение рацемических смесей спиртов с помощью липолитических микроорганизмов // Нефтехимия-99: Матер. V Междунар. конф. по интенс. нефтехим. проц. – Нижнекамск, 1999. - С. 96.

13. Мубараков А.И., Карышев А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Ацилирование гераниола в присутствии липаз микроорганизмов // Реактив-2000: Матер. XIII Междунар. конф. по произв. и примен. хим. реакт. и реаг. – Уфа-М., 2000. - С. 66.

14. Мубараков А.И., Абдрафикова Д.Г. Алкоголиз гераниола этил-3-оксибутиратом // Студент и научно-технический прогресс: Материалы XXXIX Междунар. науч. студ. конф. - Новосибирск, 2000. - С. 57-58.

15. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Этерификация гептанола-2 органическими кислотами // Реактив-2001: Матер. XIII Междунар. конф. по произв. и примен. хим. реак. и реаг. - Уфа-М., 2001. - С. 52.
16. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Биокаталитическое получение оптически активных синтонов экологически чистых средств борьбы с насекомыми – вредителями сельскохозяйственных культур // Химическая экология: Матер. шк.-сем. – Уфа: Изд.-во. БашГУ, 2001. - С. 76.
17. Зорин В.В., Петухова Н.И., Коновалов А.А., Мубараков А.И., Разработка энантиоселективных методов разделения рацемических смесей спиртов и эфиров с использованием клеток микроорганизмов // Научные исследования высшей школы в области химии и химических продуктов: Межвуз. сб. науч. тр. – Москва, 2001. – С. 81-86.
18. Мубараков А.И., Петухова Н.И., Зорин В.В. Биокаталитическое ацилирование рацемического 2-аминобутана // Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях: Матер. Всерос. заоч. конф.: Вып. 4. – Тверь: ТГТУ, 2002. - С.74.