

Литература

1. Вотинцев К. К. Физико-химический режим и жизнь планктона Селенгинского района озера Байкал. Иркутск: Изд-во АН СССР, 1963. С. 56–57.
2. Демин А. И. Структура иктоценоза литорали северо-западной части оз. Байкал // Самарская Лука. 2009. Т. 18, № 2. С. 161–167.
3. Ильина Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. № 40. С. 1–12.
4. Кожов М. М. Очерки по Байкаловедению. Иркутск: Вост.-Сиб. кн., 1972. С. 88–90.

RESEARCH AND IDENTIFICATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM BIOFILMS FORMED ON SUBSTRATES IN THE LITTORAL ZONE OF LAKE BAIKAL DURING WINTER SEASON

I. S. GAVRIKOVA¹, N. L. BELKOVA^{1,2}, E. V. SUHANOVA²

¹ Irkutsk State University, Irkutsk

² Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

Summary. Morphological, cultural, and biochemical properties of microorganisms isolated from the biofilm associations, formed in the natural habitat in the littoral zone of the lake Baikal were investigated. Bacteria differed in morphology, showed poor ability to utilize sugars and alcohols, and various degree of enzymatic activity. They were identified as *Pseudomonas* (6 strains), *Massilia* (2), *Rheinheimera* (1), and *Brevundimonas* (2).

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ D,L-ФЕНИЛГЛИЦИНОНИТРИЛА

А. Н. ГОРБУНОВА, Ю. Г. МАКСИМОВА, А. Ю. МАКСИМОВ

Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь

E-mail:anna.neustroeva.88@mail.ru

Энантиомеры фенилглицина являются ключевыми интермедиатами в синтезе полусинтетических антибиотиков. Ампициллин и цефалоспорины содержат D-фенилглицин в качестве боковых цепей [1]. L-фенилглицин является важным строительным блоком для получения некоторых антибиотиков, интермедиатом в синтезе медицинских и фармацевтических препаратов [2].

Для получения L- или D-изомеров фенилглицина возможны два пути: химический синтез с последующим разделением рацемической смеси и энзиматическое кинетическое разрешение. Последний метод предполагает гидролиз D,L-фенилглицинонитрила ферментами метаболизма нитрилов (рис. 1).

Целью настоящей работы явилось изучение процесса биотрансформации D, L-фенилглицинонитрила и получение энантиомерно чистого L-фенилглицина с максимальным энантиомерным избытком.

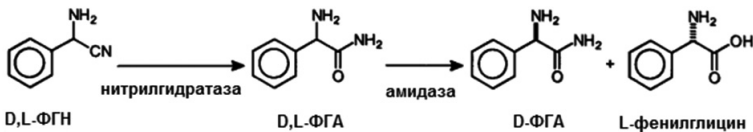


Рис. 1. Гидролиз DL-фенилглицинонитрила (DL-ФГН) нитрилгидратазой и амидазой через DL-фенилглицинамид (DL-ФГА) [3]

В данной работе был проведен скрининг бактериальных культур на наличие нитрилгидратазной и амидазной активности по отношению к фенилглицинонитрилу. В результате селекции был отобран штамм *Rhodococcus rhodochrous* 4-1, гидролизующий рацемический субстрат с максимальной скоростью.

Неселективная нитрилгидратаза и L-специфическая амидаза были выделены из биомассы *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 и совместно иммобилизованы методом поперечно-сшитых агрегатов (ПСФА) и методом ковалентной сшивки. Отмечено, что при ковалентной сшивке амидазы с активированным хитозаном, стереоселективность реакции повышается. Так, соотношение L- и D-энантиомеров фенилглицина в реакции, катализируемой ферментом в растворе, составило 87 и 13 %, тогда как в реакции, катализируемой ковалентно присоединенной к хитозану амидазой – 92 и 8 %. Показано, что самую высокую L-стереоселективность проявляли агрегаты ферментов, полученные сшивкой глутаровым альдегидом. Так, биокатализатор, полученный данным методом, катализировал гидролиз рацемического фенилглицинамида с энантиомерным избытком L-изомера 94 %. Установлено, что при сшивании молекул амидазы бензохиноном стереоселективность реакции была ниже, чем у свободного фермента (см. табл).

Амидаза		A, мкмоль/мг/мин (активность к L-изомеру)	Соотношение энантиомеров фенилглицина L : D, %	ee, %
В растворе		0,8	87 : 13	74
Ковалентно присоединенная к хитозану		0,15	92 : 8	84
ПСФА	глутаровый альдегид	0,6	99 : 5	94
	бензохинон	0,7	74 : 26	48

Изучали влияние температуры на активность и стереоселективность поперечно-сшитых агрегатов амидазы. Выявлено, что фермент проявляет максимальную активность (1,1 мкмоль/мг/мин) при температуре 40 °С, максимальный энантиомерный избыток L-фенилглицина (88 %) наблюдали при 20 °С. Дальнейшее увеличение температуры приводило к снижению активности фермента и его стереоселективных свойств (рис. 2).

Определена зависимость активности и стереоселективности иммобилизованного фермента от концентрации DL-фенилглицинонитрила в среде. Установлено, что с увеличением концентрации субстрата активность фермента увеличивается, тогда как стереоселективность реакции снижается (рис. 3). Максимальная активность иммобилизованной амидазы наблюдалась при концентрации 800 мМ и составила 1,33 мкмоль/мг/мин, максимальный энантиомерный избыток ($ee = 85\%$) – при концентрации 25 мМ.

Таким образом, определены оптимальные условия ферментативного гидролиза DL-фенилглицинонитрила, осуществлен подбор носителя, который обеспечивает увеличение энантиомерной чистоты образующегося продукта. Штамм *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 может быть использован в качестве биокатализатора для получения L-фенилглицина.

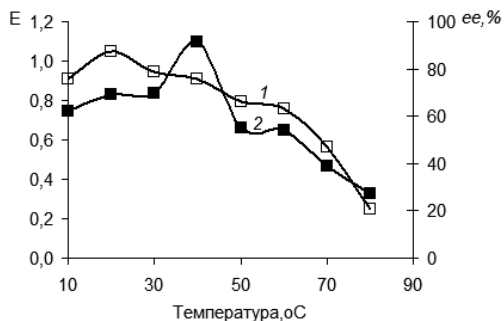


Рис. 2. Зависимость энантиомерного избытка (1) и активности иммобилизованной амидазы (2) от температуры реакции

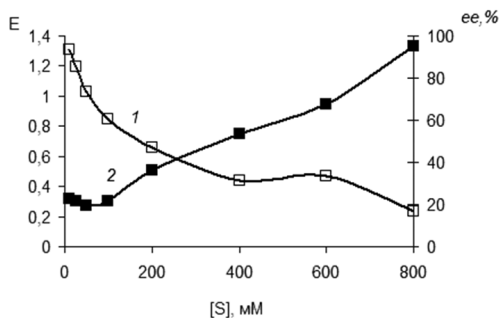


Рис. 3. Зависимость энантиомерного избытка (1) и активности иммобилизованной амидазы (2) от концентрации DL-фенилглицинамида

Литература

1. Bruggink A. Synthesis of β -lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis and process integration. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 324 p.
2. Hensel M., Lutz-Wahl S., Fischer L. Stereoselective hydration of (RS)-phenylglycine nitrile by new whole cell biocatalysts // Tetrahedron: Asymmetry. 2002. Vol. 13. № 24. P. 2629–2633.
3. Wegman M.A., Heinemann U., Rantwijk F., Stolz A., Sheldon R. A. Hydrolysis of D,L-phenylglycine nitrile by new bacterial cultures // J. Mol. Catal. B. 2001. Vol. 11. № 4. P. 249–253.

ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF DL-PHENYLGLYCINE NITRILE

A. N. GORBUNOVA, YU. G. MAKSIMOVA, A. YU. MAKSIMOV

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm

Summary. Bacterial cultures were screened for nitrile hydratase/amidase activity towards phenylglycine nitrile. A highly active strain *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 has a nonselective nitrile hydratase and extremely l-selective amidase. The amidase was isolated and immobilized. The best result was obtained with enzyme aggregates cross-linking with glutaraldehyde (CLEAs). Hydrolysis of d,l-phenylglycine nitrile catalysed by CLEAs gave l-phenylglycine with 94% ee.