

В дальнейшем планируется тестирование праймеров с более широким кругом родококков, в том числе недавно опубликованных видов, и оптимизация параметров ПЦР для увеличения специфичности разработанных праймеров.

Исследования поддержаны грантом РФН 14-14-00643.

Литература

1. Ившина И. Б., Пшеничков Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. 125 с.

2. Bell K. S. [et al.] Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. 1999. Vol. 87. P. 472–480.

ADJUSTMENT OF SPECIES-SPECIFIC PRIMERS FOR *RHODOCOCCUS JOSTII* AND *RHODOCOCCUS FASCIANUS*

A. I. KONEV¹, M. K. SEREBRENNIKOVA²

¹*Perm State National Research University, Perm*

²*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
The Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm*

Summary. A pair of primers was designed for *R. fascians*. Theoretical specificity of synthesized primers was not confirmed due to the formation of non-specific products in *R. erythropolis*, *R. imtechensis* and *R. opacus*. It was also found that the change in annealing temperature did not lead to increase the target amplification primers developed for *R. jostii* and *R. fascians*.

СИНТЕЗ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ (R)-АРИЛАЛКИЛСУЛЬФОКСИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *GORDONIA TERRAE* ИЭГМ 136

Т. И. КЫЛОВА¹, А. А. ЕЛЬКИН²

¹*Пермский государственный национальный исследовательский университет*

E-mail: tat-kylosova@yandex.ru

²*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь*

E-mail: an220@mail.ru

Энантимерно чистые сульфоксиды используются в асимметрическом синтезе в качестве активного центра, способного с высокой степенью стереоселективности контролировать различные химические реакции. В современной медицине известны препараты на основе различных сульфоксидов с выраженными антибактериальными, противовоспалительными, противоревматическими и ноотропными свойствами [1, 4]. Для направленного синтеза энантимерно однородных сульфоксидов наряду с химическим синтезом используются биотехнологические методы, которые позволяют получать оптически чистые сульфоксиды без применения агрессивных реагентов [6]. Известно, что в качестве биокатализаторов процесса сульфоксидирования могут применяться актинобактерии, обладающие высокоактивным оксигеназным ферментным комплексом. Ранее показано, что представители рода *Gordonia* и *Rhodococcus* катализируют окисление фенилметилового сульфида в оптически чистые (R)- и (S)-сульфоксиды [3]. Цель данной работы – исследование особенностей окислительной трансформации арилалкилсульфидов штаммом *G. terrae* ИЭГМ 136.

В работе использовали культуру *G. terrae* ИЭГМ 136 (GenBank: KF134399) из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ [2]. Биотрансформацию арилалкилсульфидов проводили в минеральной

среде К [2]. В работе использовали свободные и иммобилизованные клетки актинобактерий. Органические сульфиды (0,5–2 г/л), растворенные в изопропанол в соотношении 1:10, добавляли через 2 сут роста бактериальной культуры. Иммобилизацию бактериальных клеток проводили путем внесения клеточной суспензии в раствор поливинилового спирта (ПВС) согласно методике [5]. Полученный биокатализатор регидратировали в среде культивирования в течение 24 ч и добавляли из расчета 200 гранул ($5,0 \pm 0,6 \cdot 10^6$ кл/мл) на 100 мл среды. Продукты биотрансформации через 1–8 сут экстрагировали этилацетатом. Качественный состав продуктов биотрансформации контролировали методами тонкослойной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии (ХМС). Энантиомерный состав оптически активных сульфоксидов определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа LC Prominence (Shimadzu, Япония), оборудованного хиральной колонкой Кнауер® и диодно-матричным детектором (элюент: *n*-гексан : изопропанол, 95 : 5). Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин, длина волны детектирования – 254 нм; температура термостата колонки – 40 °С.

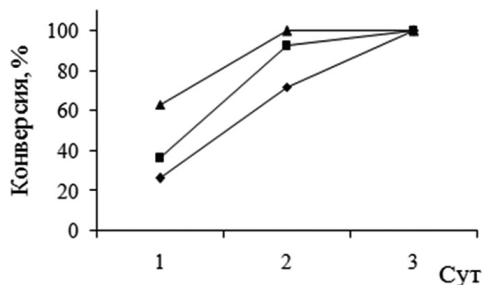
Показано, что свободные клетки актинобактерий в условиях соокисления с *n*-гексадеканом катализируют биоконверсию 0,5 г/л тиаоанизола, используемого в качестве модельного сульфида, в оптически чистый (*R*)-сульфоксид в течение 4 сут [3]. Для повышения эффективности биотрансформационного процесса использовали прием иммобилизации бактериальных клеток в криогель на основе ПВС. По данным ХМС и ВЭЖХ, иммобилизованные клетки актинобактерий катализировали направленную биотрансформацию сульфидов в концентрации 1,5 г/л с химическим выходом целевых сульфоксидов до 95 % и энантиоселективностью до 95,2 % (см. табл.).

Биотрансформация арилалкилсульфидов штаммом *G. terrae* ИЭГМ 136

Сульфид	Конверсия, %	Конфигурация сульфоксида, <i>ee</i> (%)*	Время удерживания на ВЭЖХ, мин	
			(<i>R</i>)-сульфоксид	(<i>S</i>)-сульфоксид
$C_6H_5-S-CH_3$	100	(<i>R</i>) 95,2	13,9	15,1
$C_6H_5-S-C_2H_5$	88,9	(<i>R</i>) 77,2	9,7	12,4
$CH_3CH_2CH_2-S-CH_3$	76,3	(<i>R</i>) 83,4	26,6	28,4
<i>o</i> -Cl- $C_6H_4-S-CH_3$	62,8	(<i>R</i>) 15,2	12,9	13,9
<i>o</i> -Br- $C_6H_4-S-CH_3$	61,6	(<i>R</i>) 15,8	13,7	15,0
<i>o</i> -NH ₂ - $C_6H_4-S-CH_3$	–**	(<i>R</i>) 91,1	10,9	11,4
<i>p</i> -CH ₃ $C_6H_4-S-CH_3$	86,8	(<i>R</i>) 94,9	12,9	14,2
<i>p</i> -CH ₃ O- $C_6H_4-S-CH_3$	63,0	(<i>R</i>) 20,8	13,2	14,0

**ee* – энантиомерный избыток; ** – условия ХМС анализа продуктов биотрансформации уточняются

Установлено, что увеличение количества иммобилизатов в 2 раза приводит к сокращению продолжительности процесса биотрансформации тиаоанизола (1,5 г/л) с 3 до 2 сут при сохранении высокого химического выхода (98 %) и оптической чистоты целевого сульфоксида (*ee* 95,3 %) (см. рис. ниже).



Влияние концентрации биокатализатора на процесс окисления тиаоанизола, гранул/100 мл среды: ♦ – 200, ■ – 300, ▲ – 400

Преодолеть токсическое воздействие повышенных концентраций сульфидного субстрата на бактериальные клетки позволило дробное внесение сульфида (тиоанизола, в частности) в среду культивирования. При этом начальная концентрация вносимого тиаоанизола составила 1 г/л. Последующее добавление сульфидного субстрата (0,75 г/л) осуществлялось через каждые 24 часа в течении 6 сут. Суммарная нагрузка тиаоанизола в среде биотрансформации составила 5,5 г/л, при этом выход целевого (*R*)-фенилметилсульфоксида (*ee* 96,7 %) достигал 85–90 %.

Литература

1. Babiak P., Kyslíková E., Štěpánek V. [et al.]. Whole-cell oxidation of omeprazole sulfide to enantiopure esomeprazole with *Lysinibacillus* sp. B71 // *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102. P. 7621–7626.
2. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. 2014 [www.iegm.ru/iegmcol/strains/ 08.08.2014].
3. O'mahony G. E., Kelly P., Lawrence S. E., Maguire A. R. Synthesis of enantioenriched sulfoxides // *ARKIVOC*. 2011. P. 1–110.
4. Elkin A. A., Kylosova T. I., Grishko V. V., Ivshina I. B. Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides by *Gordonia terrae* IEGM 136 and *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013. Vol. 89. P. 82–85.
5. Fernández I., Khair N. Recent developments in the synthesis and utilization of chiral sulfoxides // *Chem. Rev.* 2003. Vol. 103. P. 3651–3705.
6. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Gavrin A.Y. [et al.]. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly (vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // *J. Microbiol. Methods*. 2006. Vol. 65. P. 596–603.

SYNTHESIS OF OPTICALLY ACTIVE (*R*)-ARYL ALKYL SULFOXIDES USING *GORDONIA TERRAE* IEGM 136

T. I. KYLOSOVA¹, A. A. ELKIN²

¹ Perm State National Research University, Perm

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm

Summary. Biotransformation of aryl alkyl sulfides into optically pure (*R*)-sulfoxides with high enantioselectivity (*ee* 95%) is demonstrated by using immobilized in poly (vinyl alcohol) cryogel cells of *Gordonia terrae* IEGM 136.