



УКРАЇНА

(19) UA (11) 74768 (13) C2

(51) МПК (2006)
C12P 13/02 (2006.01)
C12N 1/20
C12N 9/88
C12R 1/03 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АМІДІВ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ AMYCOLATOPSIS, ФЕРМЕНТ, ЯКИЙ МАЄ НІТРИЛГІДРАТАЗНУ АКТИВНІСТЬ І ЯКИЙ ОДЕРЖУЮТЬ З МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ AMYCOLATOPSIS, ШТАМ МІКРООРГАНІЗМУ РОДУ AMYCOLATOPSIS (ВАРІАНТИ)

1

(21) 2000021040
(22) 22.07.1998
(24) 15.02.2006
(86) РСТ/ЕР98/04587, 22.07.1998
(31) 1776/97
(32) 22.07.1997
(33) СН
(31) 2629/97
(32) 17.11.1997
(33) СН
(31) 0815/98
(32) 06.04.1998
(33) СН
(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.
(72) Робінс Карен Трейсі, AU, Нагасава Тору, JP
(73) ЛОНЗА АГ, СН
(56) EP 0188316 A, 23.07.1986
US 5200331 A, 6.04.1993
EP 0362829 A, 11.04.1990
WAKAMOTO, AKIKO ET AL: "Manufacture of racemic 2-aminonitriles with bacteria", CHEMICAL ABSTRACTS, vol.120, no.13, 28.03.1994
(57) 1. Спосіб одержання амідів, який відрізняється тим, що нітрил, який застосовують як субстрат, перетворюють на відповідний амід з використанням мікроорганізмів роду Amycolatopsis, а також їх функціонально еквівалентних мутантів, які мають здатність перетворювати нітрил на амід, або з використанням ферменту, який має нітрилгідратазну активність, який одержують з цих мікроорганізмів.
2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що як нітрил застосовують необов'язково заміщений аліфатичний нітрил, який містить від 1 до 10 атомів вуглецю.
3. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що як нітрил застосовують необов'язково заміщений

2

ароматичний нітрил, який містить від 4 до 10 атомів вуглецю в ароматичній кільцевій системі.

4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що ароматичний нітрил вибирають із сполук загальних формул



або



(I)

(II)

де R¹ і R² позначають атом водню, атом галогену або C₁-C₄алкіл.

5. Спосіб за будь-яким із пп.1-4, який відрізняється тим, що перетворення здійснюють при температурі від 0 до 50°C і при значенні pH від 4,5 до 10.

6. Спосіб за будь-яким із пп.1-5, який відрізняється тим, що перетворення здійснюють з використанням штамів мікроорганізмів роду Amycolatopsis NA40 (DSMZ 11617) або NE31 (DSMZ 11616) або їх функціонально еквівалентних мутантів.

7. Фермент, який має нітрилгідратазну активність і який одержують із мікроорганізмів роду Amycolatopsis, а також їх функціонально еквівалентних мутантів, які мають здатність перетворювати нітрил на амід, причому для ферменту

а) pH-оптимум становить 6,5±1,0;
б) температурний оптимум при значенні pH 7,0 має діапазон від 35 до 40°C;
в) значення K_m для субстрату 3-ціанпіридину становить 41,7мМ±7,7мМ.

8. Штам мікроорганізму Amycolatopsis NA40, депонований під реєстраційним номером DSM 11617, а також його функціонально еквівалентні мутанти, які мають здатність перетворювати нітрил на амід.
9. Штам мікроорганізму Amycolatopsis NE31, депонований під реєстраційним номером DSM 11616, а також його функціонально еквівалентні мутанти, які мають здатність перетворювати нітрил на амід.

Даний винахід стосується нових мікроорганізмів

родів Actinomadura, Amycolatopsis і

(13) C2

(11) 74768

(19) UA

Rhodococcus, а також нового способу одержання амідів з використанням цих мікроорганізмів, відповідно з використанням екстракту ферментів цих мікроорганізмів.

Для одержання амідів, таких, як, наприклад, амід нікотинової кислоти, який є важливим для тварин і людей вітаміном комплексу вітамінів В, уже відомі численні біотехнологічні способи. Широко відомо, що мікроорганізми, які містять нітрилгідратазу, перетворюють нітрили на відповідні амідни. Так, [в EP-A 0188316] описано спосіб одержання амиду нікотинової кислоти з 3-ціанпіридину з використанням мікроорганізмів родів *Rhodococcus*, *Arthrobacter* або мікобактерій.

Важкою цього способу є те, що дані мікроорганізми мають лише незначну активність щодо перетворення 3-ціанпіридину на аміднікотинову кислоту.

[В EP-A 0307926] описано перетворення 3-ціанпіридину на амід нікотинової кислоти за допомогою мікроорганізмів виду *Rhodococcus rhodochrous* J1. Для того щоб ці мікроорганізми каталізували потрібне перетворення, їх слід індукувати.

Ще однією важкою цього способу є те, що *Rhodococcus rhodochrous* J1 має червоне забарвлення і внаслідок цього відбувається фарбування продукту. Крім того, цей мікроорганізм має лише незначну теплостійкість і інгібується, наприклад, субстратом 3-ціанпіримідином.

Ще один спосіб одержання амиду нікотинової кислоти з 3-ціанпіридину за допомогою мікроорганізмів виду *Rhodococcus rhodochrous* J1 описано [в EP-A 0362829]. Щоб підвищити питому активність мікроорганізмів, які містять нітрилгідратазу, у середовище для культивування у функції індуктора додають сечовину або похідне сечовини. При використанні цього способу, так само як і способу, описаного вище, відбувається фарбування продукту.

Далі [в WO 95/17505] описано спосіб одержання ароматичних амідів з відповідних нітрилів за допомогою мікроорганізмів виду *Rhodococcus rhodochrous* M33. Важкою цього способу є червоне забарвлення *Rhodococcus rhodochrous* M33, а також високе значення Км для субстрату 3-ціанпіридину.

Завдання даного винаходу - усунути згадані вади і розробити такий спосіб одержання амідів, який забезпечував би одержання відповідних амідів з високим виходом і високим ступенем чистоти.

Зазначене завдання вирішується за допомогою нових мікроорганізмів за п.п.1 і 3, а також за допомогою способу за п.6.

Суть способу за винаходом полягає в тому, що використовуваний як субстрат нітрил перетворюють на відповідний амід за допомогою мікроорганізмів роду *Actinomadura*, *Amycolatopsis* або *Rhodococcus*, за допомогою екстракту ферментів цих мікроорганізмів або за допомогою очищеної нітрилгідратази з мікроорганізмів роду *Amycolatopsis* або *Actinomadura*.

Застосовуваний для біотрансформації нітрили, такі, як, наприклад, 3-ціанпіридин, являють собою сполуки, наявні у продажу.

Мікроорганізми за винаходом мають здатність

перетворювати використовуваний як субстрат нітрили на відповідні амідни. Бажано, щоб ці мікроорганізми мали здатність рости в середовищах, які містять нітрили або амідни як єдині джерела вуглецю і/або азоту.

Мікроорганізми за винаходом одержують шляхом відповідного відбору, наприклад, із зразків ґрунту, мулу або стічних вод за допомогою звичайних мікробіологічних методів. Доцільно здійснювати відбір мікроорганізмів шляхом вирощування в середовищі, яке в бажаному варіанті містить нітрили або амідни як єдині джерела вуглецю й азоту, в присутності іонів кобальту. Придатні для здійснення відбору нітрили й амідни являють собою насамперед нітрили, які також застосовують як субстрат для наступної біотрансформації, і відповідні одержувані з них амідни. Придатні для росту середовища також відомі спеціалістів в даній галузі; наприклад, може використовуватися середовище, подане в таблиці 1.

Як правило, мікроорганізми до здійснення власне біотрансформації культивують (вирощують) у тих самих умовах, застосовуючи при цьому вищезазначені середовища.

Як відомо спеціалістам, нітрилгідратаза утворюється тільки тоді, коли середовище для росту містить іони кобальту як кофактор. Придатними "кобальтовими сполуками, що утворюють іони кобальту", є солі, які містять Co^{2+} або Co^{3+} . Прикладами солей, які містять Co^{2+} або Co^{3+} , є хлорид кобальту, сульфат кобальту й ацетат кобальту.

У функції кобальтової сполуки доцільно застосовувати сіль, яка містить Co^{2+} , таку, як, наприклад, CoCl_2 . Вирощування можна також здійснювати в присутності вітаміну B_{12} разом із металевим кобальтом або іншими кобальтовими сполуками, які *in situ* дають іони кобальту. Доцільно застосовувати кобальтову сполуку в кількості від 1 до 10 мг/л, бажано від 1 до 3 мг/л.

Як правило, вирощування здійснюють при температурі від 20 до 50°C і при значенні pH у діапазоні від 5 до 8, бажано при температурі від 30 до 45°C і значенні pH у діапазоні від 5,5 до 7,5.

Власне біотрансформацію можна здійснювати за допомогою мікроорганізмів родів *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, з використанням екстракту ферментів цих мікроорганізмів або з використанням очищеної нітрилгідратази з цих мікроорганізмів. Доцільно здійснювати біотрансформацію з використанням мікроорганізмів виду *Actinomadura spadix*, наприклад, ізолятів *Actinomadura spadix* E3733, *Actinomadura spadix* E3736, *Actinomadura spadix* 45A32, *Actinomadura spadix* 4501 або *Actinomadura spadix* C15. Бажано біотрансформацію здійснювати з використанням мікроорганізмів, які належать до видів *Amycolatopsis* NE31 і *Amycolatopsis* NA40, або їх функціонально еквівалентних варіантів і мутантів. Особливо бажано застосовувати мікроорганізми, які належать до виду *Amycolatopsis* NA40. Мікроорганізми зазначених видів, згідно з Будапештським договором, було депоновано 03.06.1997р. у Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124, Брауншвейг, Німеччина] під назвами *Amycolatopsis* NE31 і

Amycolatopsis NA40, вони дістали реєстраційні номери DSMZ 11616 і відповідно DSMZ 11617. Обидва ці мікроорганізми було точніше ідентифіковано і зараховано до ще не описаних в літературі видів роду *Amycolatopsis*.

Таким чином, винахід також стосується мікроорганізмів роду *Amycolatopsis* або *Actinomadura*, які мають здатність перетворювати амід на нітрил, насамперед мікроорганізмів, які мають назву *Amycolatopsis* NA40 (DSMZ 11617) і *Amycolatopsis* NE31 (DSMZ 11616).

При створенні винаходу далі було встановлено, що деякі мікроорганізми роду *Rhodococcus* мають кращі характеристики щодо перетворення нітрилів на амід в порівнянні з *Rhodococcus rhodochrous* J1, [описаним в EP-A 0362829]. Цими мікроорганізмами є *Rhodococcus* GF674, *Rhodococcus* GF578, *Rhodococcus* GF473, *Rhodococcus* GF270 (DSMZ 12211) і *Rhodococcus* GF376 (DSMZ 12175) або їх функціонально еквівалентні варіанти і мутанти. Згідно з Будапештським договором, в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур 15.05.1998р. було поміщено мікроорганізм, який має реєстраційний номер DSMZ 12175, а 08.06.1998р. було поміщено мікроорганізм, який має реєстраційний номер DSMZ 12211.

Штами *Rhodococcus* GF270, GF376, GF473, GF578 і GF674 після ідентифікації зараховано до ще не описаних в науковій літературі видів роду *Rhodococcus*. Таким чином, винахід також стосується мікроорганізмів *Rhodococcus* GF270, *Rhodococcus* GF376, *Rhodococcus* GF473, *Rhodococcus* GF578 і *Rhodococcus* GF674.

На відміну від мікроорганізмів роду *Actinomadura*, відповідно *Amycolatopsis* мікроорганізми роду *Rhodococcus* доцільно індукувати перед їхнім використанням для власне біосинтезу. Як індуктори придатні [описані в EP-A 0307926] індуктори, такі, як, наприклад, ацетамід, амід масляної кислоти, метакриламід, амід пропіонової кислоти, кротонамід і амід валеріанової кислоти.

Під "функціонально еквівалентними варіантами і мутантами" розуміють мікроорганізми, які походять із вищевказаних організмів-попередників і володіють в основному такими ж властивостями і функціями, що й останні. Такі варіанти і мутанти можуть виникати випадково, наприклад, у результаті опромінення ультрафіолетовим світлом, або під дією хімічних речовин, які викликають мутації.

Ідентифікація *Amycolatopsis* NA40

Колір повітряного міцелію	білий
Колір субстратного міцелію	жовто-гарячий
Колір пігменту, який дифундував	-
Спектр цукрів	
АРА	+
ГАЛ	+
МАД	-
КСИ	-
ГЛЮ	сліди
РИБ	+
Тип	A
ДАП	DL
Менахінон (у %)	
8/4	-
9/0	
9/2	+
9/4	+++

9/6	-
9/8	-
Гомологія 16S-рДНК	96,9%
Фосфоліпіди, такі як ФЕ, ОН-ФЕ, лізо-ФЕ, мет-ФЕ, ФХ, ФГА, ФИ, ФИМ, ФГ, ДФГ, ГЛ	не досліджували
Жирні кислоти	
ізо-16	+++
ізо-15	+
ізо-17	(+)
антеізо-15	(+)
антеізо-17	(+)
10-Ме-16	-
10-Ме-17	+
2-ОН-15	+
2-ОН-16	+
Тип	3f
МК	-

Ідентифікація *Amycolatopsis* NE31

Колір повітряного міцелію	білий
Колір субстратного міцелію	жовтогарячий
Колір пігменту, який дифундував	-
Спектр цукрів	
АРА	+
ГАЛ	+
МАД	-
КСИ	-
ГЛЮ	сліди
РИБ	+
Тип	A
ДАП	DL
Менахінон (у %)	
8/4	-
9/0	
9/2	+
9/4	+++
9/6	-
9/8	-
Гомологія 16S-рДНК	96,1%
Фосфоліпіди, такі, як ФЕ, ОН-ФЕ, лізо-ФЕ, мет-ФЕ, ФХ, ФГА, ФИ, ФИМ, ФГ, ДФГ, ГЛ	не досліджували
Жирні кислоти	
ізо-16	+++
ізо-15	+
ізо-17	(+)
антеізо-15	(+)
антеізо-17	(+)
10-Ме-16	-
Ю-Ме-17	+
2-ОН-15	+
2-ОН-16	+
Тип	3f
МК	-

Скорочення і пояснення, які використовувалися при ідентифікації

(+)	1-5%
+	5-15%
++	15-30%
+++	>30%
ДАП	діамінопімедінова кислота
АРА	арабіноза
ГАЛ	галактоза
МАД	мадуроза
КСИ	ксилоза
ГЛЮ	глюкоза
РИБ	рибоза

Типи цукрів дані згідно з Lechevalier й ін., 1971

Типи жирних кислот дані згідно з Kroppenstedt, 1985 і 1992

9/4	МК-9 (H ₄)
9/6	МК-9 (H ₆)
9/8	МК-9 (H ₈)
МК	міколові кислоти
ФЕ	фосфатидилетаноламін

ОН-ФЕ	гідрокси-ФЕ
мет-ФЕ	фосфатидилметилетаноламін
ФХ	фосфатидилхолін
ФГА	фосфатидилглюкозамін
ФІ	фосфатидилінозитол
ФІМ	фосфатидилінозитолманозид
ФГ	фосфатидилгліцерин
ДФГ	дифосфатидилгліцерин
ГЛ	гліколіпід
Жирні кислоти	
ізо-16	ізогексадеканові кислоти або 14-метилпентадеканові кислоти
10-Ме-18	туберкулостеаринова кислота
2-ОН-16	2-гідроксипальмітинова кислота

Ідентифікація штамів GF270, GF376, GF473, GF578 і GF674

Ідентифікацію цих штамів проводили на основі 5 незалежних один від одного характеристик

1. Морфологія і колір колоній: Короткі розгалужені гіфи, що розпадаються на елементи, які нагадують палички і спори. Колонії штамів GF270 і GF376 мають рожево-червоний колір (RAL 3022), а колонії штамів GF578 і GF674 мають яскраво-червоний колір (RAL 3012).

2. Діамінокислоти пептидогліканів: Мезодіамінопімелінова кислота.

3. Міколові кислоти: міколові кислоти *Rhodococcus*: Визначення мікової кислоти з довгим ланцюгом здійснювали за допомогою високо-температурної газової хроматографії. Профілі елювання міколових кислот штамів GF270 і GF376, а також штамів GF473, GF578 і GF674 були ідентичними. Ланцюги міколових кислот штамів GF270 і GF376 містили 38-46 атомів вуглецю, а ланцюги міколових кислот штамів GF473, GF578 і GF674 містили 40-48 атомів вуглецю. Характеристики міколових кислот порівнювали із характеристиками міколових кислот штамів *Rhodococcus*. Штам GF270 було ідентифіковано з дуже низьким коефіцієнтом кореляції (0,086) як належний до виду *Rhodococcus rhodochrous*; GF376 не можна було ідентифікувати цим методом. Інші три ізоляти GF473, GF578 і GF674 було ідентифіковано з дуже низьким коефіцієнтом кореляції як належні до виду *Rhodococcus ruber*.

4. Спектр жирних кислот: Нерозгалужені насичені і ненасичені жирні кислоти, включаючи туберкулостеаринову кислоту. Спектр жирних кислот є діагностичною ознакою для представників усіх родів *Rhodococcus* і споріднених родів *Micobacterium*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* і деяких видів коринебактерій. Ідентифікацію на видовому рівні здійснювали на основі кількісних і якісних розходжень характеристик жирних кислот штамів GF270, GF376, GF473, GF578 і GF674 і жирних кислот видів *Rhodococcus*.

5. Часткові послідовності 168-рДНК штамів GF270 і GF376 були ідентичними (100%), хоча порівняння їх з послідовностями штамів *Rhodococcus* виявило подібність тільки на 99,1% із найбільш спорідненим видом *Rhodococcus rhodochrous*.

Штами GF473 і GF578 мали ідентичні послідовності 168-рДНК (100%). Штам GF674 мав відмінність від штамів GF578 тільки в одній парі основ із 500 (99,8%). Усі три ізоляти мали лише віддалену родинну подібність із *Rhodococcus coryphillus*

(98,4%).

На основі хемотаксичних і молекулярно-біологічних даних можна зробити висновок про те, що GF270 і GF376, з одного боку, і GF473, GF578 і GF674, з іншого боку, являють собою штам двох нових видів *Rhodococcus*. За своїми послідовностями 168-рДНК штамів GF270 і GF376 є спорідненими з *Rhodococcus rhodochrous* (99,1%), а штамів GF473, GF578 і GF674 мають лише віддалену родинну подібність із *Rhodococcus coryphillus* (98,4%).

Екстракт ферментів можна отримати шляхом добре відомого фахівцям руйнування мікроорганізмів, наприклад, за допомогою ультразвуку, за допомогою преса типу Френч або з використанням лізозиму. Очевидно, що для здійснення способу цей екстракт ферментів, так само як і цілі клітини мікроорганізмів, можна імобілізувати на придатному носії, який являє собою полімер, або абсорбувати на придатному носії.

Ферменти за винаходом, які мають нітрилгідратазну активність, можна отримати із мікроорганізмів роду *Amycolatopsis*, насамперед із штамів *Amycolatopsis* NA40 (DSMZ 11617), і вони мають здатність перетворювати нітрил в амід.

Основними властивостями цих ферментів є такі:

а) рН-оптимум становить 6,5±1,0;

б) температурний оптимум при рН7,0 має межі 35-40°C;

в) значення K_m для субстрату 3-ціанпіридину становить 41,7±7,7м (20°C, 45мМ фосфатний буфер, рН7,0),

насамперед ферменти мають

г) молекулярну масу 105кДа, що можна визначити, наприклад, за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ.

Як субстрат для біотрансформації можуть застосовуватися в принципі будь-які нітрили. Доцільно застосовувати або аліфатичні нітрили, які містять від 1 до 10 атомів вуглецю, у разі потреби заміщені, наприклад, гідроксигрупою, аміногрупою, галогеном або карбоксигрупою, або заміщені чи незаміщені ароматичні нітрили, які містять від 4 до 10 атомів вуглецю в ароматичній кільцевій системі. Як аліфатичні нітрили, які містять від 1 до 10 атомів вуглецю, можуть застосовуватися динітрили, гідроксинітрили, амонітрили, такі, як, наприклад, н-октаннітрл, ціаноцтова кислота, ізокапронітрл, н-валеронітрл, адипонітрл, глутаронітрл, сукцинонітрл, себаконітрл, пропіонітрл, кротононітрл, акрилнітрл, метакрилнітрл, нітрл н-масляної кислоти або азеланітрл. Як ароматичні нітрили, які містять від 4 до 10 атомів вуглецю, можуть застосовуватися нітрили загальних формул



(I)

або



(II)

де R^1 і R^2 позначають атом водню, атом галогену або C_1 - C_4 алкіл. Атом галогену може являти собою F, Cl, Br або J.

C_1 - C_4 алкіл може являти собою метил, етил, пропіл, ізопропіл, трет-пропіл, бутил, ізобутил або

трет-бутил. Придатними представниками ароматичних нітрilів загальної формули I або II є 2-, 3- або 4-ціанпіридин, бензонітрil, фтор-, хлор-, бромбензонітрil, наприклад, орто-, мета-, пара-хлорбензонітрil або 2-хлор-3-ціанпіридин. Бажано як ароматичний нітрil, який містить від 4 до 10 атомів вуглецю, застосовувати 3-ціанпіридин.

Біотрансформацію із застосуванням одноразового або безперервного завантаження субстрату доцільно проводити таким чином, щоб концентрація субстрату не перевищувала 40мас.%, бажано 30мас.%.

Спосіб доцільно здійснювати з використанням клітин-споживачів (які не ростуть).

Як середовища для біотрансформації придатні звичайні в даній галузі техніки середовища, такі, як, наприклад, низькомолярний фосфатний буфер, буфер НЕРЕС (N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфоновна кислота), цитратний буфер, боратний буфер, середовища, склад яких поданий у таблицях 1-3, або їхні модифіковані форми, такі як, наприклад, середовище, описане в прикладі 8(1), або буфер трис-НСl.

Біотрансформацію доцільно проводити при температурі від 0 до 50°C і при значенні рН у діапазоні від 4,5 до 10, бажано при температурі від 20 до 40°C і при значенні рН у діапазоні від 4,5 до 10,0.

В оптимальному варіанті здійснення біотрансформацію можна проводити в присутності C₁-C₄спиртів. Як C₁-C₄спирти можуть застосовуватися метанол, етанол, пропанол або бутанол. Бажано застосовувати метанол.

На закінчення перетворення відповідні аміді можна виділити за допомогою звичайних методів перероблення, наприклад, за допомогою кристалізації.

Приклади

Приклад 1

Культивування мікроорганізмів родів *Actinomadura* і *Amycolatopsis*

а) У різні зразки ґрунту, поміщені в збагачувальне середовище, склад якого наведено у таблиці 1, вносили різноманітні нітрilи або аміді як джерела вуглецю й азоту й інкубували протягом 7-10 днів при 37°C або 45°C Після цього культури пересівали в таке ж середовище і ще раз культивували протягом 7-10 днів при 37°C. Весь процес повторювали тричі. Після цього культури розріджували і висівали на планшети для одержання окремих колоній. Планшети інкубували протягом 5 днів при 37°C. Після цього різноманітні колонії піддавали тестуванню на необхідну активність.

Таким шляхом виділяли штами *Amycolatopsis* NA40 (DSMZ 11617) і *Amycolatopsis* NE31 (DSMZ 11616) і потім вирощували їх в оптимізованому середовищі (таблиця 3) при струшуванні протягом 90-100 год. при 37°C.

Для *Amycolatopsis* NE31 (DSMZ 11616), *Actinomadura spadix* E3733 і *Actinomadura spadix* E3736 як джерело вуглецю й азоту використовували адипонітрil, для *Amycolatopsis* NA40 (DSMZ 11617) і *Actinomadura spadix* 45A32 як джерело вуглецю й азоту використовували азеланітрil, для *Actinomadura spadix* 4501 як джерело вуглецю й азоту використовували н-октанітрil, а для

Actinomadura spadix C15 як джерело вуглецю й азоту використовували ціаноцтову кислоту.

б) Штам *Amycolatopsis* NA40 культивували в середовищі, склад якого подано в таблиці 3. Культивування здійснювали в субкультурах (у пробірках об'ємом 4мл) і в "основній культурі" (у колбах об'ємом 500мл) в аеробних умовах при температурі 37°C протягом 2, відповідно 3-4 днів. Ріст клітин вимірювали турбідиметричним методом при довжині хвилі 610nm і суху масу клітин обраховували в такий спосіб маса сухих клітин (у мг/мл) = $ОГ_{610\text{ nm}} \times 0,277$.

Таблиця 1

Збагачувальне середовище

нітрil	2,0г
KH ₂ PO ₄	7,0г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1г
суміш вітамінів	1,0мл
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,0мг
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,0мг
додати воду до 1л (рН6,7-7,3)	

Таблиця 2

Основне середовище

мальтоза	2,0г
NaNO ₃	1,0г
K ₂ HPO ₄	0,1г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05г
додати воду до 100мл (рН7,0)	

Таблиця 3

Оптимізоване середовище

D-глюкоза	4,5г
м'ясний екстракт	0,5г
K ₂ HPO ₄	0,1г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05г
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,0мг
додати воду до 100мл (рН 7,0)	

Приклад 2

Біотрансформація з використанням мікроорганізмів родів *Actinomadura* і *Amycolatopsis*

(1) Для визначення нітрilгидратазної активності реакційну суміш (2мл), яка містить 3-ціанпіридин (1,0М, 1,0мл), калій-фосфатний буфер (рН7,0, 0,1М, 0,5мл) і 0,5мл суспензії клітин, інкубували при перемішуванні при 20°C протягом 30хв. Реакцію припиняли шляхом додавання 0,2мл 3н. НСl. Після короточасного центрифугування визначали вміст утвореного нікотинаміду за допомогою ЖХВР (система типу Shimadzu SPD 6A з C18-колоною (Develosil ODS-HG-5, 4,6×250см); розчинник: 10мМ KH₂PO₄/H₃PO₄ (рН2,8)/ацетонітрil (в об'ємному співвідношенні 9:1); швидкість потоку: 1мл/хв; абсорбцію вимірювали при 230nm). Питому активність виражали у вигляді кількості (у мкмоль) утвореного нікотинаміду/мл/хв./ОГ_{610 nm}.

Швидкості перетворення аліфатичних нітрilів у збагачувальному середовищі (таблиця 1) з використанням виділених бактерій подано в таблиці 5,

вплив індукторів і кофакторів, внесених в основне середовище (таблиця 2), подано в таблиці 4, а порівняння активності *Amycolatopsis* і *Rhodococcus* в основному середовищі (таблиця 2) подано в таблиці 6. Дані з таблиці 4 свідчать про те, що нітрилгідратаза з *Amycolatopsis* NA40 експресується конститутивним чином, проте для виявлення активності у функції кофактора потрібен кобальт.

(2) Вплив температури на ріст штаму NA40

Субкультури (2мл) інкубували в середовищі, поданому в таблиці 3, протягом 2 днів при 37°C, потім їх пересівали в 20мл середовища, поданого в таблиці 3, яке міститься в струшувальних колбах. Культивування проводили при 37, 40, 45, 50 і 55°C протягом 3-4 днів при струшуванні. Вимірювали ріст клітин і оцінювали нітрилгідратазну активність при 20°C. У таблиці 7 подано дані про вплив температури на нітрилгідратазну активність і ріст клітин.

Таблиця 4

Вплив індукторів і кофакторів на питому активність в основному середовищі

Індуктор	Ріст (ОГ _{610nm})	Загальна активність (мкмолі/мл/хв.)	Питома активність (мкмолі/мл/хв./ОГ)
-	1,26	20,9	16,6
ε-капролактam	0,66	9,52	14,5
кротонамід	3,41	22,9	6,72
метакриламід	3,33	2,46	0,74
бутирамід	2,19	0,19	0,88
пропіонамід	1,91	0,92	0,48
сечовина	1,72	2,97	1,73
Кофактор	Ріст (ОГ _{610nm})	Загальна активність (мкмолі/мл/хв.)	Питома активність (мкмолі/мл/хв./ОГ)
-	7,97	0,10	0,01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	8,32	3,36	0,40
CoCl ₂ ·6H ₂ O	8,41	47,8	5,68

Таблиця 5

Швидкості перетворення аліфатичних нітрilів при використанні виділених бактерій

Штам	Субстрат	Ріст (ОГ _{610nm})	Загальна активність (мкмолі/мл/хв.)	Питома активність (мкмолі/мл/хв./ОГ)
<i>Amycolatopsis</i> NE31 (DSMZ 11616)	адипонітрил	2,68	0,377	0,141
<i>Actinomadura</i> spadix E3733	адипонітрил	1,62	0,347	0,214
<i>Actinomadura</i> spadix E3736	адипонітрил	1,36	3,00	2,21
<i>Actinomadura</i> spadix 45A32	азеланітрил	5,81	18,8	3,23
<i>Actinomadura</i> spadix 4501	н-октаннітрил	7,24	32,2	4,45
<i>Actinomadura</i> spadix C 15	ціаноцтова кислота	2,04	7,01	3,43
<i>Amycolatopsis</i> NA40 (DSMZ 11617)	азеланітрил	5,92	33,0	5,57

Таблиця 6

Порівняння активностей *Amycolatopsis* і *Rhodococcus rhodochrous* J1

	Мікроорганізм <i>Amycolatopsis</i> NA40 (DSMZ 11617) (мкмолі/мл/хв.)	Мікроорганізм <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1
Активність щодо 3-ціанпіридину	303	314
	Очищений фермент із штаму NA40 (мкмолі/хв./мг протеїну)	Очищений фермент із штаму J1 (мкмолі/хв./мг протеїну)
Активність щодо 3-ціанпіридину	1110	371

(3) Для визначення активності штаму NA40 щодо інших субстратів клітини із сухою масою 0,0388мг інкубували в описаному вище буфері. Реакцію починали шляхом додавання відповідного субстрату і суміш інкубували при струшуванні протягом 10хв. при 20°C. Реакцію припиняли, додаючи 0,2мл 2н. HCl, і реакційну суміш центрифугували протягом короткого проміжку часу.

Надосадову рідину аналізували за допомогою ЖХВР або газової хроматографії. У таблиці 8 наведено умови дослідів із визначення специфічності щодо субстрату, а в таблиці 9 подано дані щодо специфічності спочиваючих клітин штаму NA40 стосовно різних субстратів.

Відповідні умови дослідів узагальнено в таблиці 8, а результати - у таблиці 9.

Таблиця 7

Вплив температури вирощування на нітрилгідратазну активність і на ріст клітин

Температура	Ріст (мг/мл)	Загальна активність (мкмолі/мл/хв.)	Питома активність (мкмолі/мл/хв./мг)	Відносна активність (%)
37°C	6,16	4,69	0,761	100
40°C	5,79	9,89	1,71	225
45°C	6,56	4,83	0,736	97
50°C	5,96	1,16	0,195	26

Таблиця 8

Умови дослідів для визначення специфічності щодо субстрату

Субстрат	Субстрат (мМ)	Метод аналізу	Утворений амід
3-ціанпіридин	1,0	ЖХВР	нікотинамід
2-ціанпіридин	0,25	ЖХВР	2-піколінамід
4-ціанпіридин	0,25	ЖХВР	піридин-4-карбоксамід
кротонітрил	0,4	ЖХВР	кротонамід
бензонітрил	0,03	ЖХВР	бензамід
акрилнітрил	0,4	ЖХВР	акриламід
орто-хлорбензонітрил	0,15	ЖХВР	орто-хлорбензамід
мета-хлорбензонітрил	0,15	ЖХВР	мета-хлорбензамід
пара-хлорбензонітрил	0,15	ЖХВР	пара-хлорбензамід
2-хлор-3-ціанпіридин	0,15	ЖХВР	2-хлорнікотинамід
ацетонітрил	0,4	ГХ	ацетамід
пропіонітрил	0,4	ГХ	пропіонамід
метакрилнітрил	0,4	ГХ	метакриламід
н-бутиронітрил	0,4	ГХ	н-бутирамід

Примітка: орто-, мета-, пара-хлорбензонітрил і 2-хлор-3-ціанпіридин додали в реакційну суміш у вигляді розчину в метанолі.

Таблиця 9

Специфічність нітрилгідратази штаму NA40 щодо субстрату

Субстрат	Відносна активність (%)	Субстрат	Відносна активність (%)
3-ціанпіридин	100	мета-хлорбензонітрил	75
4-ціанпіридин	168	пара-хлорбензонітрил	16
2-ціанпіридин	128	2-хлор-3-ціанпіридин	126
бензонітрил	51	ацетонітрил	-
кротонітрил	52	пропіонітрил	105
акрилнітрил	115	метакрилнітрил	130
орто-хлорбензонітрил	96	н-бутиронітрил	194

(4) Температурний оптимум клітин у спокої та їхня теплостійкість

Реакцію проводили протягом 10хв. у стандартній реакційній суміші. Температурний оптимум був у діапазоні від 35 до 40°C (мал.5). Після цього клітини інкубували протягом 30хв. при різноманітних температурах і оцінювали активність у стандартних реакційних умовах. Як видно з мал.4, теплостійкість зберігалася приблизно до 40°C.

(5) pH-оптимум і pH-стабільність клітин у спокої

Для визначення цих характеристик проводили реакцію протягом 10хв. у стандартній реакційній суміші, в якій калій-фосфатний буфер заміняли різноманітними 0,1М буферами. Як видно з мал.6, оптимальне значення pH має діапазон від 4,5 до 10. Після інкубації клітинної суспензії протягом 30хв. при 20°C при різноманітних значеннях pH клітини центрифугували. Потім клітини промивали і ресуспендували в 0,1М калій-фосфатному буфері з pH7,0. Реакцію проводили протягом 10хв. у стандартних умовах, додаючи 3-ціанпіридину. Фермент залишався стабільним при значеннях pH у діапазоні від 4,5 до 10,0 (мал.7).

(6) Накопичення нікотинамиду. одержуваного з 3-ціанпіридину з використанням штаму NA40

Реакцію проводили в реакційній суміші (30мл), яка містить 500мМ 3-ціанпіридин, 40м калій-фосфатний буфер (pH7,0) і клітини у спокої (суха маса 2,3мг). У ході реакції 7 раз додали 3-ціанпіридин (500м) відповідно до витрати попере-

дньої порції. Таким чином, протягом 15год. було внесено 4,0 молі 3-ціанпіридину, у результаті утворилося 3,89 молів (475г/л) нікотинамиду, який відповідає виходу 97,3%. Нікотинова кислота не утворювалася.

Приклад 3

Ідентифікація мікроорганізмів роду *Amycolatopsis*

Ідентифікація ґрунтувалася на використанні таких 5 хемотаксономічних маркерів:

1. Діагностична амінокислота пептидоглікану: мезо-діамінопімелінова кислота.

2. Діагностичні цукри: арабіноза і галактоза.

3. Міколові кислоти: міколових кислот немає.

4. Менахінон: МК-9 (H₄).

5. Спектр жирних кислот: ізо/антеізо-розгалужені і 2-гідроксижирні кислоти, крім того, виявлено незначні кількості 10-метилрозгалужених жирних кислот. Такий спектр жирних кислот виявлено у всіх представників роду *Amycolatopsis* (спектр жирних кислот 3f).

Комбінація цих хімічних ознак достатня для виявлення всіх видів роду *Amycolatopsis*.

Характеристики жирних кислот обох культур порівнювали з інформацією, наявною в банку даних жирних кислот, з використанням аналізу основних компонентів. За допомогою цього методу виявилось можливим зарахувати як штам NE31, так і штам NA40 до роду *Amycolatopsis*, проте здійснити видову ідентифікацію виявилось неможливим, тому що коефіцієнт кореляції був надто

низьким. Проте на основі порівняння спектра жирних кислот обох штамів було встановлено, що вони являють собою два штами, які належать до різноманітних видів.

Цей факт було підтверджено результатами аналізу послідовності 16S-рДНК. У цьому випадку також було встановлено належність до роду *Amvcolatopsis*, однак належність до жодного з описаних видів роду *Amvcolatopsis* не було встановлено. За допомогою цього методу шляхом прямого секвенування було визначено послідовність 16S-рДНК, отримана в результаті ампліфікації з використанням ПЦР гена 16S-рДНК. Діагностичну частину послідовності 16S-рДНК порівнювали з послідовностями типових представників видів роду *Amvcolatopsis* і родинних таксонів. Результати показали, що штам належить до роду *Amvcolatopsis*. Було виявлено найбільшу подібність з *Amvcolatopsis methanolica*, що становить для штаму NA40 96,9% і для штаму NE31 96,1%. Подібність послідовностей обох штамів між собою становила 99,0%. Дослідження заявників, проведені на представниках роду *Amvcolatopsis*, свідчать про те, що для надійної ідентифікації видів коефіцієнт кореляції повинен бути вищим ніж 99,5%. Оскільки розмір 96,9% істотно менший ніж 99,5%, то можна припустити, що обидва ізоляти не належать до представників відомих видів *Amvcolatopsis*.

На основі поданих результатів ізоляти не можна зарахувати до будь-якого з відомих видів *Amvcolatopsis*. Заявники виходили з того, що NA40 і NE31 являють собою штами двох нових, дотепер не описаних видів роду *Amvcolatopsis*.

Ідентифікаційні характеристики мікроорганізмів соду *Amvcolatoosis*

Колір повітряного міцелію	
Колір субстратного міцелію	
Колір пігменту, який дифундував	
Спектр цукрів	+
АРА	
ГАЛ	+
МАД	-
КСИ	-
ГЛЮ	v
РИБ	+
Тип	A
ДАП	DL
Менахінон (γ %)	
8/4	-

9/0	(+)
9/2	+
9/4	++
9/6	-
9/8	-
Гомологія 168-рДНК	>99,5%
Фосфоліпіди	
ФЕ	+
ОН-ФЕ	+
лізо-ФЕ	-
мет-ФЕ	-
ФХ	-
ФГА	-
ФІ	+
ФІМ	v
ФГ	+
ДФГ	+
ГЛ	*
Тип	П+ОН-ФЕ
Жирні кислоти	
ізо-16	+++
ізо-15	+
ізо-17	(+)
антеізо-15	+
антеізо-17	(+)
10-Ме-16	(+)
10-Ме-17	+
2-ОН-15	+
2-ОН-16	+
Тип	3f
МК	-

Приклад 4

Очищення нітрілгідратази з мікроорганізму штаму NA40

Штам культивували при 37°C протягом 3 днів у середовищі, склад якого наведено у таблиці 3. Клітини 2-літрової культури збирали центрифугуванням і потім ресуспендували в 0,85%-ому розчині NaCl. Після цього клітини переносили в 0,1М калій-фосфатний буфер (pH7,0), який містить 44мМ н-масляну кислоту, і обробляли ультразвуком. Екстракт клітин центрифугували і відокремлювали клітинний дебрис. Цей екстракт застосовували для очищення ферменту.

Протягом усього очищення застосовували калій-фосфатний буфер (pH7,0), який містить 44мМ н-масляну кислоту. Як видно з таблиці 10, фермент після трьох стадій очищення досягав гомогенного стану.

Таблиця 10

Очищення нітрілгідратази зі штаму NA40

	Загальна активність (одиниці)	Загальний протеїн (мг)	Питома активність (од./мг)	Збагачення
екстракт без клітин	73300	1020	71,9	1
DEAE-Sephacel	68000	110	620	8,62
феніл-TOYOPEARL	64800	61,4	1105	15,4

Примітка: 1 одиниця відповідає кількості ферменту, що каталізує утворення нікотинаміду зі швидкістю 1мкмоль/хв. при 20°C.

Приклад 5

Вивчення властивостей нітрілгідратази

(1) Визначення молекулярної маси, структури субодиниць і вмісту іонів кобальту

За допомогою хроматографії на колонках типу G3000 SW (0,75×60см) із TSK-гелем з використан-

ням 0,1М калій-фосфатного буфера (pH7,0) із додаванням 0,2М KCl і 44мМ н-масляної кислоти було встановлено, що молекулярна маса дорівнює 106кДа. Було виявлено, що фермент складається з 2 різних субодиниць α і β, молекулярні маси яких відповідно дорівнюють 30000 і 26000 Да.

На мал.1 показано діаграму визначення моле-

кулярної маси за допомогою хроматографії на колонці G3000 SW із TSK-гелем.

На мал.2 показано діаграму визначення молекулярної маси за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ.

На мал.3 показано спектр поглинання очищеного ферменту. Було виявлено широку смугу пог-

линання при 300-400нм.

(2) Специфічність очищеного ферменту щодо субстрату

Визначення специфічності щодо субстрату проводили аналогічно до прикладу 2(1). Результати подано в таблиці 11.

Таблиця 11

Специфічність очищеної нітрілгідратази щодо субстрату

Субстрат	(М)	Загальна активність (мкмолі/мл/хв)	Відносна активність (%)	
			ферментативна реакція	реакція з використанням клітин у спокої
3-ціанпіридин	1,0	17,7	100	100
2-ціанпіридин	0,25	39,1	221	128
4-ціанпіридин	0,25	31,6	179	168
кротонітрил	0,4	11,9	67	52
бензонітрил	0,03	11,3	64	51
акрилнітрил	0,4	16,6	94	115
орто-хлорбензонітрил	0,15	22,4	127	96
мета-хлорбензонітрил	0,15	15,9	90	75
пара-хлорбензонітрил	0,15	2,30	13	16
2-хлор-3-ціанпіридин	0,15	16,0	90	126
ацетонітрил	0,4	-	-	-
пропіонітрил	0,4	39,3	222	105
метакрилнітрил	0,4	22,1	125	130
н-бутиронітрил	0,4	17,9	101	194

У реакційну суміш (2,0мл) додали 1,7 одиниці ферменту. Реакційна суміш містила відповідний субстрат в 45мМ фосфатному буфері (рН7,0).

(3) Визначення значення K_m

Значення K_m , яке визначали на основі діаграми Lineweaver-Burk, для 3-ціанпіридину становить 41,7мМ, а для акрилнітрилу 3,7мМ. Порівняння зі штамом *Rhodococcus rhodochrous* J1, в якого значення K_m для 3-ціанпіридину становить 200мМ, показує, що даний параметр у штаму NA40 має істотно меншу величину. Це одна з основних переваг штаму NA40.

(4) Теплостійкість і температурний оптимум

Очищений фермент інкубували при різних температурах протягом 30хв. при рН7,0 і потім протягом 1хв. при 20°C оцінювали перетворення 3-ціанпіридину на амід нікотинової кислоти. При температурі вище ніж 40°C фермент втрачав активність.

Теплостійкість, як і у випадку клітин у спокої, зберігалася приблизно до 40°C, температурний

оптимум був у діапазоні від 35 до 40°C (мал.5).

(5) рН-оптимум і рН-стабільність

Для визначення цих характеристик проводили реакцію перетворення 3-ціанпіридину на амід нікотинової кислоти при 20°C в реакційній суміші (2,0мл), яка містить різні буфери (42,5мМ), 1,71 одиниці очищеного ферменту і 500мМ 3-ціанпіридин. рН-Оптимум становив приблизно 6,5±1,0 (мал.8).

Щоб оцінити рН-стабільність, інкубували 4,2 одиниці очищеного ферменту протягом 1год. при 20°C в різних буферах (45мМ). Частина інкубованого розчину (1,71 одиниці) додали в стандартну реакційну суміш (порівн. приклад 2(1)). Оцінювали збережену активність. Фермент зберігав стабільність при значеннях рН у діапазоні від 5 до 9. Результати подано на мал.9.

(6) Інгібітори

Оцінювали вплив різноманітних інгібіторів. Результати узагальнено в таблиці 12.

Таблиця 12

Вплив різноманітних інгібіторів на активність очищеного ферменту

Інгібітор	мМ	Відносна активність (%)
-		100
N-етилmaleїнімід	1	97
йодоцтова кислота	1	39
4-хлорртутьбензойна кислота	0,1	69
азид натрію	1	59
гідроксиламін	1	37
фенілгідазин	1	8
семікарбазин	1	82
тирон (двонатрієва сіль 4,5-дигідрокси-1,3-бензолдисульфонової кислоти)	1	110
орто-фенантролін	1	89
α-, α'-дипіридил	1	100
8-гідроксипінолін	1	110
ЕДТК (етилендіамінтетраоцтова кислота)	1	115
діетилдитіокарбамат	1	89

Приклад 6
Вплив метанолу на клітини в спокої штаму NA40
Реакцію проводили протягом 10хв. при різно-

манітних концентраціях (0-20об.%) метанолу в реакційних сумішах, склад яких наведено в таблиці 13. Як видно з таблиці 14, активність підвищується при додаванні 5-15% метанолу.

Таблиця 13

Реакція з використанням клітин у спокої

	Методи				
	1	2	3	4	5
1,0М 3-ціанпіридин	1,0мл	1,0мл	1,0мл	1,0мл	1,0мл
0,1М КФБ*(рН7,0)	0,9мл	0,8мл	0,7мл	0,6мл	0,5мл
метанол	-	0,1мл	0,2мл	0,3мл	0,4мл
суспензія клітин (0,388мг/мл)	0,1мл	0,1мл	0,1мл	0,1мл	0,1мл
Загальний об'єм	2,0мл	2,0мл	2,0мл	2,0мл	2,0мл

Примітка: * КФБ позначає калій-фосфатний буфер.

Таблиця 14

Вплив метанолу на активність штаму Amycolatopsis NA40

Методи	Метанол [об. %]	Відносна активність [%]
1	0	100
2	5	123
3	10	128
4	15	130
5	20	105

Приклад 7
Накопичення мікроорганізмів роду Rhodococcus

Різні зразки ґрунту вносили в збагачувальне середовище, склад якого наведено в таблиці 1 і яке містило як джерело вуглецю й азоту ціаноцтову кислоту, і згідно з методом, описаним в прикладі 1, виділяли мікроорганізми Rhodococcus GF270, GF57S, GF473 і GF376.

Приклад 8

Біотрансформація з використанням мікроорганізмів роду Rhodococcus

(1) Теплостійкість мікроорганізмів Rhodococcus GF674, Rhodococcus GF578, Rhodococcus GF270 і Rhodococcus GF376 порівняно з Rhodococcus rhodochrous J1.

Для визначення теплостійкості, перераховані вище мікроорганізми культивували в нижчеописаних середовищах.

Штам Rhodococcus rhodochrous J1 культивували протягом 72год. у середовищі, описаному в ЕР-А 0307926. Мікроорганізми Rhodococcus GF674, GF578, GF270 і GF376 культивували протягом проміжку часу до 96год. при рН7,0 у таких середовищах.

Штам Rhodococcus GF674 культивували в середовищі, що містить 1,0г/л екстракту дріжджів, 5,0г/л фруктози, 10,0г/л солодового екстракту, 5,0г/л ацетаміду, 2,0г/л KH_2PO_4 , 0,5г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 10,0мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Штам Rhodococcus GF578 культивували в середовищі, що містить 1,0г/л екстракту дріжджів, 15,0г/л фруктози, 10,0г/л солодового екстракту, 25,0г/л ацетаміду, 2,0 /л KH_2PO_4 , 0,5г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 5,0мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Штам Rhodococcus GF270 культивували в середовищі, що містить 12,5г/л екстракту дріж-

джів, 5,0г/л цитрату натрію, 7,5г/л метакриламід, 2,0г/л KH_2PO_4 , 0,5г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 30,0мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Штам Rhodococcus GF376 культивували в середовищі, що містить 1,0г/л екстракту дріжджів, 10,0г/л цитрату натрію, 15,0г/л солодового екстракту, 7,5г/л бутирамід, 2,0г/л KH_2PO_4 , 0,5г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 15,0мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Потім клітини у спокої інкубували протягом 15хв. при різноманітних температурах, після чого визначали збережену активність у стандартних реакційних умовах згідно з прикладом 2(1).

При цьому було встановлено, що штам Rhodococcus GF674 при температурі 50°C має відносну активність, близьку до 100%, а при 60°C ще зберігає приблизно 10% активності. Штам Rhodococcus GF578 при температурі 50°C також має відносну активність, що становить 100%, і має відносну активність, що становить 20% при 60°C. Штам Rhodococcus GF376 має 100%-у відносну активність при температурі до 50°C, 70%-у активність при 60°C і при 70°C зберігає ще приблизно 5%-у відносну активність. Rhodococcus GF270 має майже 100%-у відносну активність при температурі до 60°C і також ще зберігає при 70°C 5%-у відносну активність. Порівняно з цим штам Rhodococcus rhodochrous J1 зберігає до 50°C 100%-у відносну активність, при 60°C має 80%-у активність і при 70°C повністю втрачає активність.

Таким чином, можна стверджувати, що штам Rhodococcus GF270 і GF376 мають кращу теплостійкість порівняно зі штамом J1, при цьому штам GF270 має найвищу теплостійкість.

(2) Оптимальне значення рН для штамів Rhodococcus

Вплив значення рН на нітрілгідратазну активність штамів Rhodococcus GF674, GF578, GF270 і

GF376 визначали аналогічно до прикладу 2(5).

Оптимальне значення pH для штаму *Rhodococcus* GF674 становить 7,5-9,5, для GF578 становить 8-8,5, для GF270 становить 6-7,0 і для GF376 становить 6-8.

(3) Специфічність штамів *Rhodococcus* щодо субстрату

Дані про специфічність щодо субстрату у вигляді значень відносної активності узагальнено в таблиці 15.

(4) Накопичення нікотинаміду штамми *Rhodococcus*

Штами *Rhodococcus* GF674, GF578, GF270 і GF376 культивували аналогічно до прикладу 2(6) з використанням як субстрат 3-ціанпіридину (приблизно 500м). При цьому штам *Rhodococcus* GF674 продукував протягом 25год. 6М нікотинаміду, штам GF578 продукував протягом 10год. 5,5М нікотинаміду, штам GF270 продукував протягом 20год. приблизно 8,5М нікотинаміду і штам GF376 продукував протягом 20год. 7,5М нікотинаміду.

(5) Толерантність активності штамів *Rhodococcus* щодо 3-ціанпіридину

Для вивчення толерантності щодо 3-

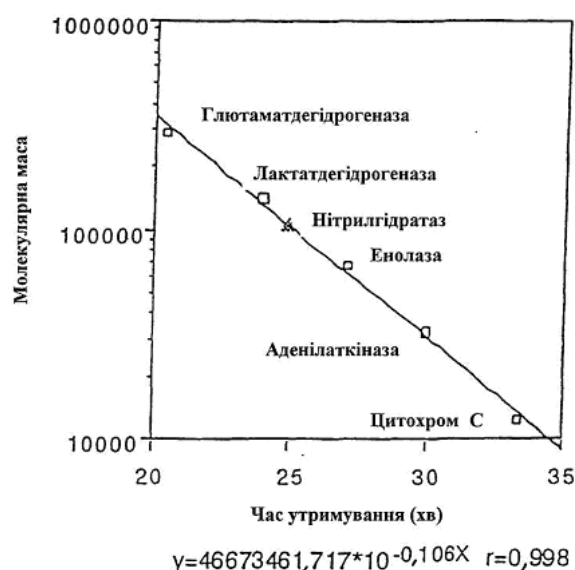
ціанпіридину клітини у спокої інкубували протягом 15хв. при 20°C при концентраціях 3-ціанпіридину в діапазоні від 1 до 10% (мас/об.), після чого клітини центрифугували. Після промивання клітин 0,85%-им NaCl вимірювали збережену активність.

Толерантність щодо 3-ціанпіридину як субстрат вивчали при різноманітних концентраціях субстрату. Було встановлено, що при концентрації субстрату 2% (мас/об.) нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus rhodochrous* J1 знижується в 1,4 рази, нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus* GF674 знижується в 1,4 рази при концентрації субстрату 4% (мас/об.), нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus* GF578 залишається практично сталою аж до концентрації субстрату 8%, нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus* GF270 знижується в 1,7 рази при концентрації субстрату 4% (мас/об.) і нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus* GF376 знижується в 1,25 рази при концентрації субстрату 10% (мас./об.).

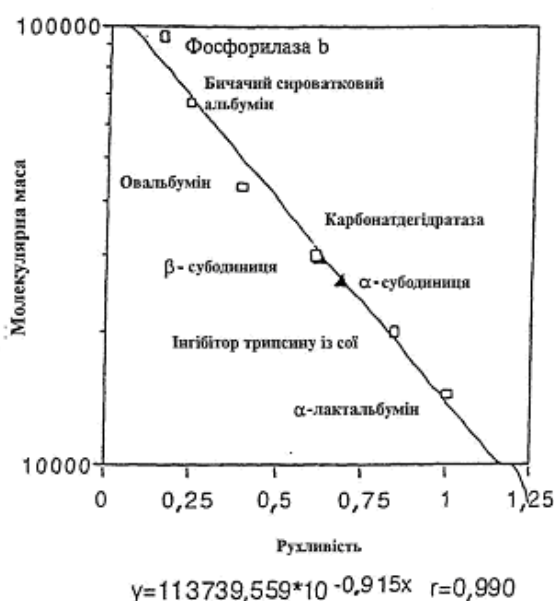
Штами *Rhodococcus rhodochrous* J1 мають найгіршу толерантність щодо 3-ціанпіридину порівняно з іншими штамми *Rhodococcus*.

Таблиця 15

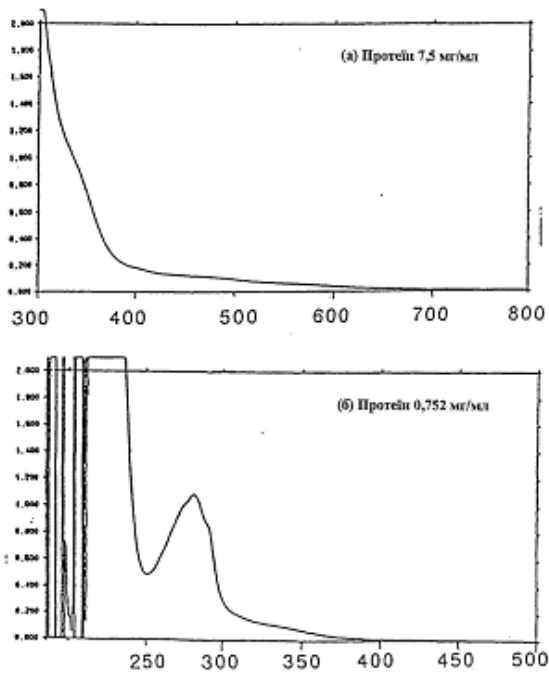
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	<i>Rhodococcus</i> GF674	<i>Rhodococcus</i> GF578	<i>Rhodococcus</i> GF270	<i>Rhodococcus</i> GF376
3-ціанпіридин	100 (%)	100 (%)	100 (%)	100 (%)	100 (%)
2-ціанпіридин	45	308	200	15,7	54,3
4-ціанпіридин	70	231	167	55,6	79,8
бензонітрил	27	138	85,1	13,4	57,2
2-хлорбензонітрил	2,8	64,8	49,0	0	0
3-хлорбензонітрил	43	27,8	28,9	8,41	8,63
4-хлорбензонітрил	13	0	0	0	0
ацетонітрил	608	1,49	347	659	806
пропіонітрил	434	274	132	37,3	245
н-бутиронітрил	352	491	368	181	195
акрилнітрил	478	147	101	192	257
кротонітрил	78,2	98,0	124	37,1	110
метакрилнітрил	86,9	176	122	0	0



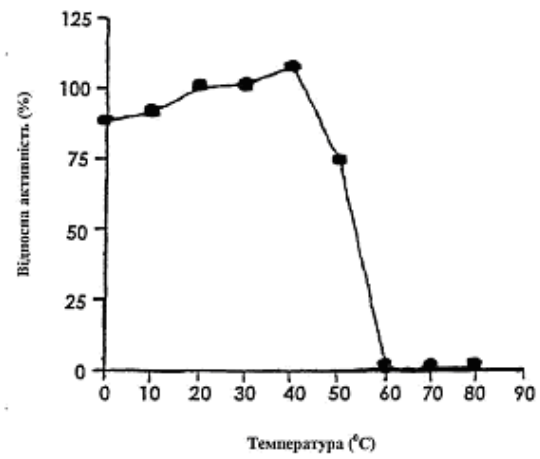
МАЛ. 1



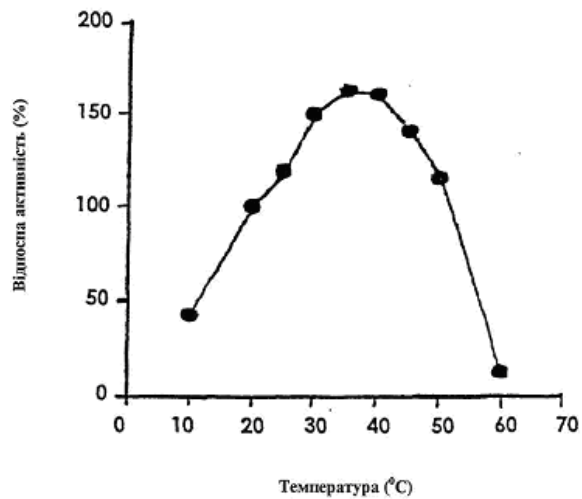
МАЛ. 2



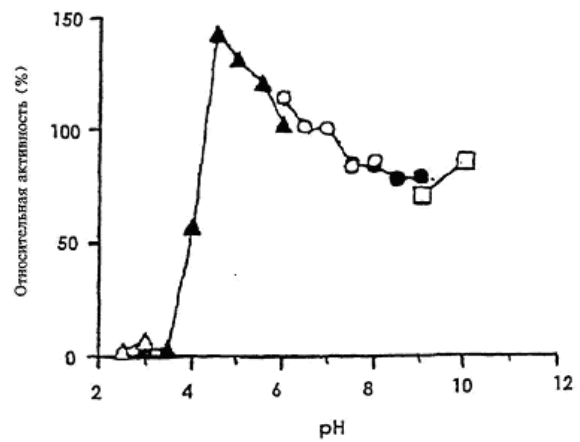
МАЛ. 3



МАЛ. 4

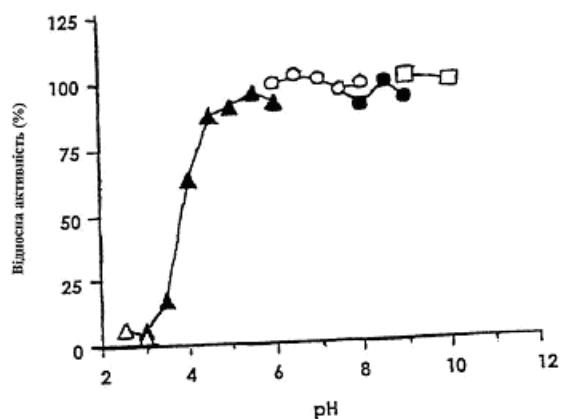


МАЛ. 5



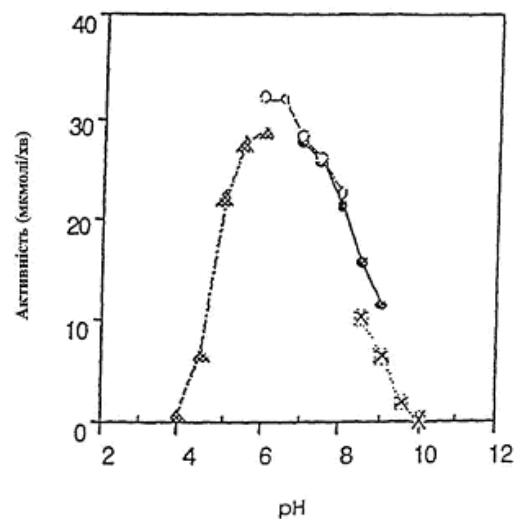
- △— Буфер гліцин-HCl
- ▲— Лимонна кислота/натрій-цитратний буфер
- Калій-фосфатний буфер
- Буфер трис-HCl
- Буфер гліцин-NaOH

МАЛ. 6



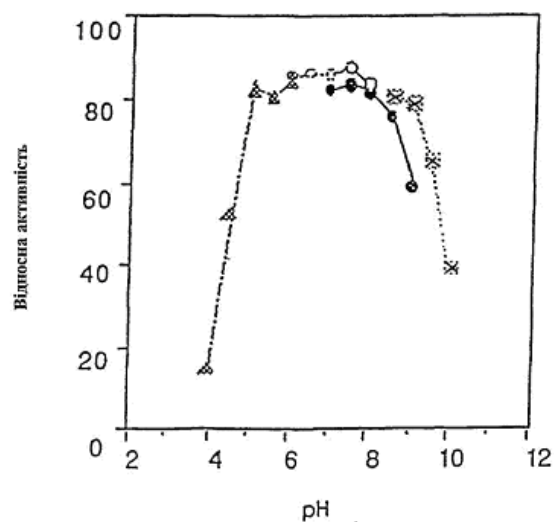
- △— Буфер гліцин-HCl
- ▲— Лимонна кислота/натрій-цитратний буфер
- Калій-фосфатний буфер
- Буфер трис-HCl
- Буфер гліцин-NaOH

МАЛ. 7



- △— Лимонна кислота/натрій-цитратний буфер
- Калій-фосфатний буфер
- Буфер трис-HCl
- ×— Буфер H_3BO_3 -NaOH

МАЛ. 8



- △— Лимонна кислота/натрій-цитратний буфер
- Калій-фосфатний буфер
- Буфер трис-HCl
- ×— Буфер H_3BO_3 -NaOH

МАЛ. 9