



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 48953

(13) C2

(51) 6 C12P11/00, C12N9/78, C12R1:01, 1:05

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ α -ЗАМІЩЕНИХ РАЦЕМІЧНИХ 4-МЕТИЛТІО-БУТАНОВИХ КИСЛОТ

1

2

(21) 97041904

(22) 19 09 1995

(24) 16 09 2002

(86) PCT/FR95/01196, 19 09 1995

(31) 94/11301

(32) 22 09 1994

(33) FR

(31) 95/02615

(32) 07 03 1995

(33) FR

(46) 16 09 2002, Бюл. № 9, 2002 р

(72) Фавре-Бюлле Олівєр, FR, Бонтокс Марі-Клод,

FR, Ларгеау Деніс, FR, Аріагно Андре, FR

(73) РОН-ПУПЕНК НУТРИШЕН ЕНІМАЛ, FR

(56) EP 610049, 10 08 94

EP 610048, 10 08 94

JP 04341185, 22 11 91

EP 348901, 03 01 90

EP 486289, 20 05 92

(57) 1 Способ получения α - замещенных рацемических 4-метилтио-бутановых кислот, отличающийся тем, что α - замещенные рацемические 4-метилтиобутиронитрилы гидролизуют с помощью нитрилазы, продуцируемой микроорганизмами, выбранными из группы *Alcaligenes faecalis* ATCC-8750, *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FERM BP-3857 или *Gordona terrae* FERM BP-4535

2 Способ по п. 1, отличающийся тем, что α - замещенным рацемическим 4-метилтиобутирони-

трилом является 4-метилтио-2-гидроксibuтирони-трил

3 Способ по п. 1, отличающийся тем, что pH - значение среды составляет от 4 до 11

4 Способ по п. 3, отличающийся тем, что pH - значение среды составляет от 5 до 9

5 Способ по п. 1, отличающийся тем, что температура гидролиза составляет $30 \div 60^\circ \text{C}$

6 Способ по п. 5, отличающийся тем, что температура гидролиза составляет $30 \div 50^\circ \text{C}$

7 Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация α - замещенного 4-метилтиобутиронитрила в исходном растворе составляет $10 \div 400 \text{ ммоль}$

8 Способ по п. 7, отличающийся тем, что концентрация α - замещенного 4-метилтиобутиронитрила в исходном растворе составляет $50 \div 200 \text{ ммоль на литр}$

9 Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация α - замещенной 4-метилтио-бутановой кислоты в растворе составляет $10 \div 2000 \text{ ммоль на литр}$

10 Способ по п. 9, отличающийся тем, что концентрация α - замещенной 4-метилтио-бутановой кислоты в растворе составляет $100 \div 1500 \text{ ммоль на литр}$

Настоящее изобретение относится к использованию нитри-лазы в качестве катализатора гидролиза нитрильной группы до карбоксильной группы. Более конкретно оно относится к использованию нитрилазы, выбираемой из нитрилаз микроорганизмов вида *Alcaligenes*, *Rhgdocaccu^A* или *Gordona*, и более конкретно *Alcaligenes faecalis*, депонированного под номером ATCC 8750, *Rhodococcus* p. HT 29-7, депонированного под номером PERM BP-3857, или *Gordona terrae* MA-1, депонированного под номером FERM BP-4535

Нитрилаза *Alcaligenes faecalis* описывается, например, в европейском и японском патентах,

опубликованных под соответствующими номерами EP 348 901 и JP 03 224 496, причем оба патента принадлежат фирме Асахи. В этих патентах, в частности, в европейском патенте, нитрилазу используют для получения из рацемических нитрилов оптически активных кислот. Предпочтительные исходные нитрилы замещены в α -положении и включают алкильную цепь, содержащую предпочтительно 1-3 атома углерода, или ароматический радикал. В примере 11 вышеуказанного европейского патента описывается гидролиз рацемического нитрила миндальной кислоты с помощью *Alcaligenes faecalis* R - (-)-миндальную

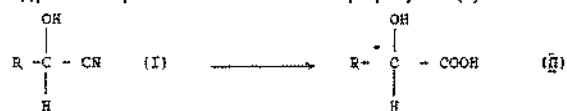
(13) C2

(11) 48953

(19) UA

кислоту получают с избытком энантиомера равным 91%. В европейском патенте 486 289 и в соответствующем ему американском патенте США 5 326 702 фирмы NITTO CHEMICAL описывается использование *Alcaligenes sp* BC 35-2 (FERM №11265 или FEP M-BP-3318) для гидролиза нитрила миндальной кислоты в присутствии сульфата, в этом случае миндальную кислоту получают с избытком одного энантиомера около 98%.

В патенте Японии JP 04 341 185 фирмы Асахи описывается получение и использование нитриказы *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 для решения проблем получения оптически чистых соединений из их рацемических нитрилов. Селективная в отношении одного из энантиомеров нитриказы, описываемая в вышеуказанном патенте Японии, предпочтительно гидролизует 2-гидроксинитрил следующей ниже общей формулы (I) до 2-гидроксикарбоновой кислоты формулы (II)



в которых R означает возможно замещенную арильную группу или возможно замещенную гетероциклическую группу. В этом патенте указывается, что гидролиз нитрила миндальной кислоты с помощью вышеуказанной нитриказы позволяет получать 100% избытка одного энантиомера в виде R-(-)-миндальной кислоты. В примере 5 указывается, что вышеуказанную нитриказу можно использовать для гидролиза алифатических нитрилов, как валеронитрил, акрилонитрил, 2-галогенпропионитрилы, хлорацетонитрил. Однако, здесь ничего не говорится об энантиоселективности этого гидролиза в отношении алифатических нитрилов, обладающих асимметрическим центром.

В тексте этого патента также уточняется, что нитриказа *Alcaligenes faecalis* обладает оптимальной активностью при pH-значении от 6,5 до 8,0, температура использования вышеуказанного фермента, согласно этой ссылке, всегда должна быть ниже 45°C.

Совершенно неожиданно обнаружено, что если вышеуказанный фермент *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 использовать для гидролиза 4-метилтио-2-гидроксипропионитрила, то этот гидролиз протекает без всякой селективности в отношении оптически чистых изомеров. Этот фермент гидролизует вышеуказанный нитрил с образованием рацемической смеси двух кислот без всякого предпочтения в отношении того или другого из изомеров.

Нитриказа *Rhodococcus sp* HT 29-7, депонированная под номером FERM BP-3857, описывается, например, в европейском и американском патентах, опубликованных под соответствующими номерами EP 610 049 и США 5 296 373, причем оба принадлежат фирме NITTO.

Согласно этим патентам, и в частности патенту США, нитриказу используют для получения оптически активных кислот из рацемических нитрилов, содержащих фенильную группу. Все исходные нитрилы содержат ароматический радикал, причем речь идет по существу о гидролизе

нитрила миндальной кислоты или его производных, замещенных в ароматическом ядре. В примере 1 вышеуказанного патента США описывается гидролиз рацемического нитрила миндальной кислоты с помощью *Rhodococcus sp* HT 29-7, причем R (-) - миндальную кислоту получают с избытком энантиомера 100%. В примере 2 описывается гидролиз замещенных в ароматическом ядре производных нитрила миндальной кислоты, причем избыток одного из энантиомеров производного миндальной кислоты также составляет 100%, то же самое наблюдают, когда проводят гидролиз нитрилов бензальдегида.

В европейском патенте 610 049 фирмы NITTO CHEMICAL описывается использование *Rhodococcus sp* HT 29-7 (FERM BP-3857), *Alcaligenes sp* BC 35-2 (FERM BP-3318) или *Brevibacterium acetylum* IAM 1790 для гидролиза - гидроксинитрилов, замещенных в гамма-положении ароматическим ядром, до оптически активной - гидроксикарбоновой кислоты, замещенной фенильной группой. Получаемые с помощью *Rhodococcus sp* HT 29-7 кислоты всегда содержат избыток одного энантиомера, изменяющийся в зависимости от исходного нитрила и в зависимости от присутствия или отсутствия фосфорной кислоты (pH среды около 8,2).

Совершенно неожиданно обнаружено, что если вышеуказанный фермент *Rhodococcus sp* HT 29-7 (FERM BP-3857) использовать для гидролиза 4-метилтио-2-гидроксипропионитрила, то этот гидролиз протекает без всякой селективности в отношении энантиомеров. Этот фермент гидролизует вышеуказанный нитрил с образованием рацемической смеси двух кислот без предпочтительного образования того или другого из изомеров.

Нитриказа *Gordonia terrae* MA-1, депонированная под номером FERM BP-4535, описывается в европейском патенте O 610 048 для гидролиза нитрилов, содержащих в гамма-положении фенильную группу и в альфа-положении гидроксильную группу, до соответствующей оптически активной кислоты. Избыток одного энантиомера во всех примерах составляет от 92% до 100%.

Совершенно неожиданно обнаружено, что если вышеуказанный фермент *Gordonia terrae* MA-1 использовать для гидролиза 4-метилтио-2-гидроксипропионитрила, то этот гидролиз протекает без какой-либо селективности в отношении энантиомеров. Этот фермент гидролизует вышеуказанный нитрил с образованием рацемической смеси двух кислот без предпочтительного получения того или другого из изомеров.

Настоящее изобретение относится к способу получения рацемических альфа-замещенных 4-метилтио-бутановых кислот путем гидролиза альфа-замещенных рацемических 4-метилтиобутиронитрилов с помощью нитриказы одного из следующих микроорганизмов: *Alcaligenes faecalis*, депонированный под номером ATCC 8750, *Rhodococcus sp* HT 29-7, депонированный под номером FERM BP-3857, или *Gordonia terrae* MA-1, депонированный под номером - TERM BP-4535.

Согласно способу изобретения, микроорганизм может быть использован таким, какой есть, или иммобилизованным на хорошо известных

специалисту носителях

Кроме того, генетическая информация, которая кодирует фермент, может быть передана от одного родственного микроорганизма (такого, как *A. faecalis* ATCC 8750) к другому микроорганизму, такому, как *Bacillus subtilis*.

В качестве одного из вариантов способа согласно изобретению, вместо микроорганизма в свободном виде или в иммобилизованном используют соответствующее количество фермента, который полностью или частично очищен.

Из альфа-замещенных 4-метилтиобутиронитрилов предпочтительно используют 4-метилтио-2-гидроксibuтиронитрил, который позволяет получать гидрокси-аналог рацемического метионина. При таком варианте получения производных метионина избегают образования побочных неорганических соединений в значительных количествах, удаление которых вызывает все больше и больше проблем в связи с защитой окружающей среды.

Эти ферменты в рамках настоящего изобретения обладают нитрилазной активностью в области pH-значений, составляющих от 4 до 11, и оптимальной активностью при pH-значении в пределах от 5 до 9. Оптимальная температура их использования составляет 30-60°C, однако предпочтительно их использовать при температуре в пределах от 30 до 50°C.

Предпочтительно работают с концентрациями нитрила в исходном растворе от 10 ммоль до 400 ммоль на литр и предпочтительно от 50 ммоль до 200 ммоль на литр. Концентрация получаемой аммониевой соли кислоты мало влияет на активность фермента, если эта концентрация ниже 2 моль на литр, предпочтительно, от 0,1 до 1,5 моль на литр.

Изобретение более полно описывается с помощью нижеследующих примеров, которые не ограничивают его.

Пример 1

Микроорганизм *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 выращивают в следующей среде:

ацетат аммония	10 г/л
дрожжевой экстракт	5 г/л
пептон	5 г/л
дигидрофосфат калия (K_2HPO_4)	5 г/л
гептагидрат сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,2 г/л
гептагидрат сульфата железа - (II) ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$)	30 мг/л
хлорид натрия	1 г/л
бензонитрил	0,5 г/л
pH=2	

Культивирование осуществляют при 30°C в колбах Эрленмейера емкостью 2 л, содержащих 600 мл среды. Содержимое перемешивают в течение 30 часов со скоростью 150 оборотов в минуту. Осадок из клеток извлекают, промывают раствором хлорида натрия с концентрацией 9 г/л, затем замораживают.

Рабочие условия для гидролиза бутиронитрила следующие:

4-метилтио-2-гидроксibuтиронитрил	50 ммоль
клетки	5 мг/мл
фосфатный буфер	200 ммоль

температура

30°C

продолжительность

4 часа

Изучение кинетики гидролиза 4-метилтио-2-гидроксibuтиронитрила показывает линейное продуцирование 2,8 ммоль гид-рокси-аналога метионина в час и на мг сухих клеток. Избыток одного из энантиомеров образующейся кислоты определяют с помощью жидкостной хроматографии: он составляет 0% при выходе кислоты 80%.

Пример 2

Оценивают стабильность фермента, наблюдая за кинетикой продуцирования гидрокси-аналога метионина в течение 150 часов при использовании свободных клеток.

Рабочие условия следующие:

4-метилтио-2-гидроксibuтиронитрил	100 ммоль
клетки	10 мг/мл
фосфатный буфер 300 мМ	5 мл
температура	25°C

Нитрил вводят последовательно путем добавления 100 ммоль по мере потребления нитрила. Образование соответствующей кислоты представлено в таблице 1.

Таблица 1

Время (часы)	Образовавшаяся кислота (ммоль/литр)	Активность (ммоль/час мг сухих клеток)
0	0	0
2	39	1,7
17	230	1,3
24	312	1,1
47	466	1,2
70	556	0,4
172	860	0,6
180	940	0,6

Начальная активность составляет 2 ммоль/час мг сухих клеток. Этот пример доказывает стабильность фермента, несмотря на присутствие кислоты в высоких концентрациях (0,9 моль гидрокси-аналога метионина).

Пример 3

Стабильность фермента в зависимости от количества субстрата и количества образовавшейся кислоты была измерена в следующих условиях:

Стабильность фермента в зависимости от количества субстрата

нитрил	см. Таблицу
клетки	10 мг/мл
фосфатный буфер 300 мМ, pH=7,0	5 мл
температура	25°C
продолжительность	1 час

Концентрация нитрила (ммоль)	Активность (ммоль/час мг сухих клеток)
50	2
100	2
150	2
200	2
500	0

Стабильность фермента в зависимости от ко-

личества образовавшейся кислоты, Рабочие условия
нитрил 50ммоль
клетки 2,5мг/мл
фосфатный 100мм буфер, pH=7,0 1мл
температура 30°C
продолжительность 2 часа

Концентрация кислоты (ммоль)	Активность (ммоль/час мг сухих клеток)
0	3,2
100	4,5
200	3,8
300	4,1
400	4
500	4
600	3,4
700	2,8

Пример 4 Очистка нитрилазы

Клетки *Alcaligenes faecalis* культивируют в течение 24-х часов при 30°C в среде, описанной в примере 1

После центрифугирования культуры, осадок обрабатывают буфером с pH=7,5 (25мм ТРИС-HCl, 10% (вес/объем) глицерина) Суспензию клеток подвергают ультразвуковой обработке, затем центрифугируют, чтобы получить неочищенный экстракт Этот неочищенный экстракт затем обрабатывают сульфатом аммония до 30 % насыщения Полученный осадок снова суспендируют в буфере с pH=7,5, затем подвергают диализу против 2 л того же самого буфера в течение ночи

Полученный раствор затем вносят в анионообменную колонку с Q -Сефарозой Fast Flow HR 26/10®, предварительно уравновешенной с буфером, имеющим pH=7,5 Активную нитрилазу затем элюируют с помощью градиента от 0 до 1М раствора хлорида натрия

Активные фракции затем помещают в анионообменную колонку с MOHO-Q - HR 5/5®, предварительно уравновешенной с буфером, имеющим pH=7,5 Нитрилазу элюируют с помощью градиента от 0 до 1М раствора хлорида натрия

Содержащие активную нитрилазу фракции объединяют, затем добавляют 1М раствор сульфата аммония Этот раствор вносят в колонку для гидрофобных взаимодействий с фенил-сефарозой HR 5/5®, предварительно уравновешенной с буфером, имеющим pH=7,5, к которому добавлен 1моль сульфата аммония Активную нитрилазу затем элюируют с помощью градиента от 1 до 0 М раствора сульфата аммония

Молекулярную массу протеина определяют путем гель-фильтрации Она составляет около 260 килодальтонов При электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия наблюдают единственную полосу 43 килодальтона (чистота 95 %)

Кинетика гидролиза 4-метилтио-2-гидроксипутиронитрила до гидрокси-аналога метионина с помощью нитрилазы *A. faecalis* является линейной

Время (часы)	Активность (ммоль/час, мг протеина)	Выход реакции (%)
--------------	-------------------------------------	-------------------

0	0	1
0,5	150	3
1	171	5
21,5	150	68
24,8	150	77
29	150	87

Пример 5 Влияние pH-значения Рабочие условия

нитрил 50ммоль
протеин 50мкг/мл
ацетатный 100мм буфер с pH=4-5
фосфатный 100мм буфер с pH=6-7 1мл
буфер ТРИС-HCl, 100мм, с pH=8-9
боратный 100мм буфер с pH=10-11
температура 30°C
продолжительность 1-2 часа

pH	Активность (ммоль/час мг протеина)
4	0
5	42
6	232
7	272
8	405
9	412
10	158
11	0

Пример 6 Влияние температуры Рабочие условия

нитрил 50 ммоль
протеин 50 мкг/мл
фосфатный буфер 100мм с pH=7,0
температуры, изменяющиеся от 4°C до 60°C
продолжительность 1 час

Оптимальная температура функционирования фермента составляет 50°C

Температура в °C	Активность (ммоль/час мг протеина)
4	45
10	67
20	140
30	272
40	419
50	570
60	333

Сравнительный пример с нитрилом миндальной кислоты

Рабочие условия
нитрил миндальной кислоты 7ммоль
протеин 5мкг/мл
фосфатный буфер 100мм с pH=7,0 1мл
температура 30°C

Время (минуты)	Активность (ммоль/час мг протеина)	Избыток одного энантиомера
15	1000	1
60	1030	1

Очищенная нитрилаза, следовательно, энан-

тиоселективна в отношении нитрила миндальной кислоты, но не энантиоселективна в отношении 4-метилтио-2-гидроксипутиронитрила

15

Пример 7

Гидролиз 4-метилтио-2-гидроксипутиронитрила с помощью *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FEBM BP-3857

Микроорганизм *Rhodococcus* sp. HT 29-7 FEBM BP-3857 культивируют в следующей среде

глицерин	20 г/л
дрожжевой экстракт (ДИФКО)	3 г/л
дигидрофосфат калия K_2PO_4	1 г/л
динатрийгидрофосфат 12 H_2O	4,4 г/л
сульфат натрия Na_2SO_4	2,8 г/л
гексагидрат хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$)	0,85 г/л
дигидрат хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 2 H_2O$)	0,05 г/л
гидрат сульфата марганца - (II) ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0,033 г/л
гептагидрат сульфата желе- 3а - (II) ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,013 г/л
гептагидрат сульфата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,005 г/л
бензонитрил	0,05 г/л
pH=7,5	

Культивирование осуществляют при 30°C в колбах Эрленмейера емкостью 2 л, содержащих 600 мл среды. Содержимое перемешивают в течение 140 часов со скоростью 150 оборотов в минуту. Осадок клеток извлекают, промывают раствором хлорида натрия с концентрацией 9 г/л, затем замораживают.

Влияние pH-значения на гидролиз

Рабочие условия

4-метилтио-2-гидроксипутиронитрил	100 ммоль
оптическая плотность при 660 нм	15
ацетатный буфер 100 мМ с pH=4-5	
фосфатный буфер 100 мМ с pH=6, 0-7,0	1 мл
100 мМ буфер ТРИС-HCl с pH=8,0-9,0	
боратный буфер 100 мМ с pH=10,0-11,0	
температура	30°C
продолжительность	10 часов

pH-Значение	Выход кислоты
4	0%
5	100%
6	100%
7	100%
8	100%
9	100%
10	20%
11	0%

Пример 8 Влияние концентрации субстрата. Стабильность фермента в зависимости от количества субстрата также определяют в следующих условиях

4-метилтио-2-гидроксипутиронитрил	см таблицу
оптическая плотность при 660 нм	20
фосфатный буфер 300 мМ с pH=7,0	5 мл

температура 30°C
продолжительность 2 часа

Концентрация нитрила (ммоль)	Выход кислоты
50	90%
100	44%
200	22%
300	10%
400	0%
500	0%

Пример 9 Стабильность фермента в зависимости от количества образующейся кислоты

Рабочие условия,
4-метилтио-2-гидроксипутиронитрил 100 ммоль
оптическая плотность при 660 нм 15
фосфатный буфер 100 мМ с pH=7,0 1 мл
температура 30°C
продолжительность 6 часов

Концентрация кислоты (ммоль)	Выход кислоты
0	100%
200	100%
400	100%
600	100%
800	100%
1000	100%

Пример 10 Избыток энантиомера

4-метилтио-2-гидроксипутиронитрил 140 ммоль
оптическая плотность при 660 нм 14
фосфатный буфер 100 мМ с pH=7,0 1 мл
температура 20°C

Время инкубации (часы)	Выход кислоты (%)	Оптическая чистота
2	15	0
6	50	0
24	100	0

Изучение кинетики гидролиза 4-метилтио-2-гидроксипутиронитрила показывает продуцирование по линейной зависимости гидрокси-аналога метионина в час и на мг сухих клеток. С помощью жидкостной хроматографии определяют наличие избытка какого-либо энантиомера образовавшейся кислоты, этот избыток равен 0% при выходе кислоты от 15 % до 100%.

Пример 11, Влияние температуры

Рабочие условия

4-метилтио-2-гидроксипутиронитрил 100 ммоль
оптическая плотность при 660 нм 15
фосфатный буфер 100 мМ с pH=7,0 1 мл
температура см таблицу
продолжительность 6 часов

Температура (°C)	Выход кислоты (%)
10	70
20	100
30	100
40	100

50	31
60	15
Пример 12 Гидролиз 4-метилтио-2-аминобутиронитрила	
Рабочие условия	
4-метил-2-гидроксibuтиронитрил	23ммоль
оптическая плотность при 660нм	15
фосфатный буфер 100мМ с pH=7,0	1мл
температура	30°C

Время (часы)	Выход кислоты (%)	Избыток одного эквивалента кислоты
0,5	40	не определен
1	51	0,12
2	62%	не определен
5	78%	0,15

Пример 13

Условия культивирования, используемые для *Gordona terrae*

МА-1

(FER M BP-4535) следующие

глицерин	10г/л
дрожжевой экстракт	0,4г/л
гидрофосфат калия K_2HPO_4	6,8г/л
гидрофосфат натрия с 12 H_2O ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$)	1,1г/л
сульфат натрия Na_2SO_4	2,8г/л
гексагидрат хлорида магния $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,4г/л
дигидрат хлорида кальция $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	40мг/л
гидрат сульфата марганца - (II) $MnSO_4 \cdot H_2O$	4мг/л
хлорид железа - (III)	0,6мг/л
сульфат цинка	0,3мг/л
бензонитрил	0,5г/л
pH=7,2	

Активность фермента

Культивированные клетки затем промывают, после чего вводят в контакт с гидроксиметилтиобутиронитрилом для количественного анализа активности

Рабочие условия	
концентрация нитрила	23ммоль
концентрация клеток	6,8г/л
100мМ фосфатный буфер	
pH=7,0 , температура = 35°C	

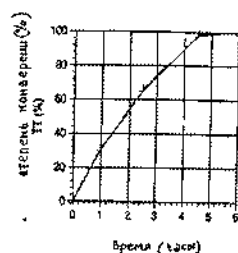


Рисунок 3: Гидролиз циангидрина АМТР с помощью *Gordona terrae* штамма МА-1

Кинетика гидролиза гидроксиметилтиобутиронитрила линейная

Начальная скорость составляет 13ммоль/час г сухих клеток

Пример 14 Влияние концентрации циангидрина АМТР на активность нитрилазы

Определяют влияние начальной концентрации гидроксиметилтиобутиронитрила на активность нитрилазы, результаты приводятся в следующей таблице

Рабочие условия	
концентрация клеток	100 мм
5,1г/л	
фосфатный буфер pH=7,0, тем-	
пература = 35°C	

Кинетику измеряют для времени 0,5, 1, 2 и 3 часов

Концентрация нитрила (ммоль)	Активность (ммоль/час г сухих клеток)
50	14
100	13
200	15
300	0
400	0

Вплоть до 200ммоль активность мало изменяется с изменением концентрации субстрата

Пример 15 Влияние концентрации гидроксиналога мети-онина на нитрилазную активность

В этом опыте исследуют влияние концентрации 4-гидрокси-2-метилтио-бутаноата аммония на нитрилазную активность

Рабочие условия	
концентрация клеток	5г/л
концентрация нитрила	100ммоль
100мМ фосфатный буфер с pH=7,0	
температура	35°C

Концентрацию карбоксилата аммония изменяют в пределах от 0 до 1,5моль

Концентрация кислоты (моль/л)	Активность (мкмоль/час мг сухих клеток)
0	9,4
0,5	14
1	19
1,5	15

Концентрация 4-гидрокси-2-метилтиобутаноата аммония практически не изменяет начальную активность штамма *Gordona terrae* HT 29-7

Пример 16 Влияние pH-значения и температуры

Рабочие условия	
концентрация нитрила	100ммоль
концентрация клеток	7,5г/л
100мМ ацетатный буфер с pH=4-5	
100мМ фосфатный буфер с pH=6-7	
100мМ ТРИС-HCl буфер с pH=8-9	
100мМ боратный буфер с pH=10-11	
температура	30°C
кинетика за время 1,2,4 и 8 часов	

pH-Значение	Активность (ммоль/час г сухих клеток)
4	0,6
5	2,5
6	7,8
7	9,6
8	15,3

13		48953	14	
9	18		<div> <div>Температура (°C)</div> <div>Активность (ммоль/час г сухих клеток)</div> </div>	
10	5,7			
11	11			
<div> <div>Оптимальное значение pH составляет около 8-9 в условиях, предложенных заявителем</div> <div>Влияние температуры на нитрилазную активность <i>Gordona terrae</i> MA-1</div> <div>Рабочие условия</div> <div>концентрация нитрила 100ммоль</div> <div>концентрация клеток 7,5г/л</div> <div>100ммМ фосфатный буфер с pH=7,0</div> <div>кинетика за 1 час</div> </div>				
				<div>Оптимальная температура составляет 40-50°C</div>

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ "Міжнародний науковий комітет"
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71