



УКРАЇНА

(19) UA (11) 82982 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 1/20

C12N 9/78

C12P 13/02 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

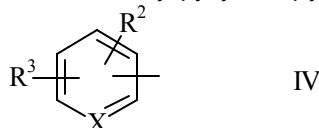
(54) МІКРООРГАНІЗМ, ЯКИЙ ЯВЛЯЄ СОБОЮ ШТАМ RHODOCOCCLUS SP. FZ4, ЗДАТНИЙ ПЕРЕТВОРЮВАТИ АЦЕТОНІТРИЛ В АМІД, НІТРИЛГІДРАТАЗА, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АМІДІВ ТА ЗАСТОСУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМУ ДЛЯ ЗНИЩЕННЯ АБО УТИЛІЗАЦІЇ ВІДХОДІВ АЦЕТОНІТРИЛУ

1

(21) 2003077000  
(22) 08.01.2002  
(86) PCT/EP02/00103, 08.01.2002  
(31) 01100493.4  
(32) 09.01.2001  
(33) EP  
(31) 60/342,373  
(32) 27.12.2001  
(33) US  
(46) 10.06.2008, Бюл.№ 11, 2008 р.  
(72) РОБІНС КАРЕН ТРЕЙСІ, АУ/CN, НАГАСАВА ТОРУ  
(73) ЛОНЗА АГ  
(56) EP A 0307926, 22.03.1989.  
DE C 4313649, 26.01.1995.  
LANGDAHL BJARNE R ET AL: "Nitrile hydrolysis of Rhodococcus erythropolis BL1, an acetonitrile-tolerant strain isolated from a marine sediment" MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 1, 1996, pages 145-154, XP001037265, ISSN: 1350-0872.  
TORU NAGASAWA ET AL: "NITRILE HYDRATASE-CATALYZED PRODUCTION OF NICOTINAMIDE FROM 3-CYANOPYRIDINE IN RHODOCOCCLUS THODOCHROUS J1" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 54, no. 7, 1 July 1988 (1988-07-01), pages 1766-1769, XP000106560, ISSN: 0099-2240.  
WATANABE I ET AL: "SCREENING ISOLATION AND TAXONOMICAL PROPERTIES OF MICROORGANISMS HAVING ACRYLONITRILE-HYDRATING ACTIVITY" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 51, no. 12, 1987, pages 3193-3200, XP001062886, ISSN: 0002-1369.  
ASANO Y ET AL: "ALIPHATIC NITRILE HYDRATASE FROM ARTHROBACTER SP. J-1 PURIFICATION AND CHARACTERIZATION" AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, JAPAN SOC. FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND AGROCHEM. TOKYO, JP, vol. 5, no. 46, May 1982 (1982-05), pages 1165-1174, XP001068503, ISSN: 0002-1369.

2

(57) 1. Мікроорганізм, який являє собою штам Rhodococcus sp. FZ4, депонований під реєстраційним номером DSM 13597, і його функціонально еквівалентні варіанти і мутанти, які здатні перетворювати ацетонітрил в амід, причому нітрилгідратазна активність у відношенні до ацетонітрилу складає  $K_m = 2,84 \pm 1,00 \text{ mM}$ , а у відношенні до 3-ціанпіридину, відповідно,  $K_m = 80,5 \pm 15,0 \text{ mM}$ , при оптимальному значенні pH, яке становить  $6,5 \pm 1,0$ .  
2. Нітрилгідратаза, яка одержана з мікроорганізму за пунктом 1 і яка характеризується тим, що  
а) її  $K_m$ -значення для ацетонітрилу, який служить субстратом, становить  $2,84 \pm 1,00 \text{ mM}$ , а для 3-ціанпіридину, який служить субстратом, становить  $80,5 \pm 15,0 \text{ mM}$ ;  
б) оптимальне для неї значення pH становить  $6,5 \pm 1,0$ .  
3. Ферментативний екстракт, який містить нітрилгідратазу за пунктом 2.  
4. Спосіб одержання амідів загальної формули  
$$R^1\text{-CONH}_2, \quad \text{III}$$
у якій  $R^1$  означає  $C_{1-6}$ алкільний залишок,  
 $C_{2-6}$ алкєнільну групу або групу загальної формули



у якій X означає атом азоту або групу  $\text{CH=}$ , а  $R^2$  і  $R^3$  незалежно один від одного означають атом водню, атом галогену,  $C_{1-6}$ алкільну групу або  $C_{2-6}$ алкєнільну групу, який відрізняється тим, що нітрил загальної формули

$$R^1\text{-CN}, \quad \text{II}$$

у якій  $R^1$  має вказані вище значення, піддають перетворенню за допомогою мікроорганізму за пунктом 1, ферментативного екстракту за п. 3 або ферменту за пунктом 2.

5. Спосіб за п. 4, який відрізняється тим, що як нітрил використовують 3-ціанпіридин або ацетонітрил.

(13) C2

(11) 82982

(19) UA

6. Спосіб за п. 4 або 5, який **відрізняється** тим, що перетворення проводять при температурі від 5 до 50 °C і значенні pH від 5 до 10.

7. Застосування мікроорганізму за пунктом 1 для знищення або утилізації відходів ацетонітрилу.

Даний винахід стосується мікроорганізмів, які здатні залишатися толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 3-молярних концентраціях, ферменту з нітрилгідратазною активністю, способу одержання амідів із застосуванням таких мікроорганізмів, відповідно ферменту, а також застосування цих мікроорганізмів для знищення (утилізації) відходів ацетонітрилу.

В даний час відомо вже досить багато біотехнологічних методів одержання амідів, таких, наприклад, як амід нікотинової кислоти, який являє собою незамінний для тварин і людини вітамін із сімейства вітамінів В.

Так, наприклад, у [EP-A 0307926] описаний спосіб перетворення 3-ціанпіридину в амід нікотинової кислоти за допомогою мікроорганізмів *Rhodococcus rhodochrous* J1. Недолік цього способу полягає в тому, що мікроорганізми *Rhodococcus rhodochrous* J1 мають червоний колір, і тому кінцевий продукт також набуває відповідного забарвлення. Крім цього такий мікроорганізм характеризується високим  $K_{mT}$ -значенням (константа Міхаеліса) для 3-ціанпіридину, який використовується як субстрат, а також має низьку толерантність до температури і низьку толерантність до 3-ціанпіридину.

Крім цього в заявці [WO 99/05306] описаний спосіб одержання амиду нікотинової кислоти виходячи з відповідного нітрилу за допомогою мікроорганізмів родів *Rhodococcus*, *Amycolatopsis* і *Actinomadura*. Недолік цього відомого способу полягає в тому, що мікроорганізми роду *Amycolatopsis*, які використовуються при його здійсненні, інактивуються при підвищених температурах. Ці мікроорганізми мають, крім того, низьку толерантність до 3-ціанпіридину й амиду нікотинової кислоти. Мікроорганізми роду *Rhodococcus* характеризуються високим  $K_{mT}$ -значенням для 3-ціанпіридину і малою теплостійкістю. Тому реалізація описаного у вказаній заявці способу в промисловому масштабі є економічно недоцільною.

В основу даного винаходу була поставлена задача запропонувати мікроорганізми, які були б більш стійкими, характеризувалися б більш низьким  $K_{mT}$ -значенням для такого субстрату, як, наприклад, 3-ціанпіридин, і відповідно до цього забезпечували б рентабельне одержання амідів способом, при здійсненні якого відповідний амід можна було б виділяти з винятково високим виходом і з високим ступенем чистоти.

Вказана задача вирішується за допомогою мікроорганізмів згідно із п.1 формули винаходу, за допомогою ферменту згідно із п.5 або 7 і за допомогою способу згідно із п.8.

Запропоновані у винаході мікроорганізми одержують шляхом відповідного відбору, наприклад, із зразків ґрунту, з мулу (шламу) або стічних вод за допомогою традиційних мікробіологічних методів. Подібний відбір мікроорганізмів доцільно проводи-

ти шляхом їх вирощування або культивування в присутності піридинальдоксиму загальної формули



або нітрилів як джерела вуглецю й у присутності іонів кобальту і, наприклад, дріжджового екстракту і/або амонієвих солей. Потім з отриманих культур відбирають ті мікроорганізми, які здатні залишатися толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 3-молярній концентрації і які здатні перетворювати нітрили, такі, наприклад, як 3-ціанпіридин і ацетонітрил, у відповідний амід.

Як піридинальдокси можна використовувати піридин-2-, піридин-3- або піридин-4-альдоксим.

Для відбору відповідних мікроорганізмів можуть використовуватися також насамперед ті нітрили, які при наступній біотрансформації повинні використовуватися як субстрат, наприклад ацетонітрил (нітрил оцтової кислоти), пропіонітрил, бутиронітрил, нітрил кротонової кислоти, нітрил адипінової кислоти і нітрил маленової кислоти.

Як джерело іонів кобальту переважно використовувати так звані "кобальтові сполуки, які генерують іони кобальту", наприклад  $\text{Co}^{2+}$ - або  $\text{Co}^{3+}$ -солі, такі як хлориди кобальту, сульфати кобальту й ацетати кобальту. Переважно як кобальтову сполуку використовувати  $\text{Co}^{2+}$ -сіль, таку, наприклад, як  $\text{CoCl}_2$ . Разом з тим мікроорганізми можна культивувати і разом з металевим кобальтом або іншими його сполуками. Звичайно кобальт або його сполуки додають у середовище для вирощування в кількості від 1 до 30 мг/л, переважно від 1 до 20 мг/л.

Як амонієві солі можна використовувати, наприклад, фосфати амонію, такі як  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  або  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ .

Мікроорганізми перед використанням їх власне в процесі біотрансформації культивують у відповідних середовищах. Склади придатних для цієї мети культуральних середовищ наведені, наприклад, нижче в даному описі в таблиці 3 або 5.

Звичайно мікроорганізми вирощують при температурі від 20 до 40 °C і при значенні pH від 5 до 8, переважно при температурі від 25 до 35 °C і значенні pH від 6 до 7,5.

У процесі вирощування мікроорганізмів доцільно індукувати активні ферменти, тобто нітрилгідратази, додаванням відповідного індуктора ферментів.

Як такі індуктори ферментів можуть використовуватися насичені або ненасичені аліфатичні нітрили або відповідні аміді. Як аліфатичні нітрили можна застосовувати всі  $\text{C}_{2-7}$ -алканнітрили, такі, наприклад, як бутиронітрил, ізобутиронітрил, ніт-

рил валеріанової кислоти або нітрил ізовалеріанової кислоти, або  $C_3$ -алкеннітрили, такі, наприклад, як метакрилнітрил або нітрил кротонової кислоти. Як аліфатичні аміді можна застосовувати всі  $C_2$ -алканаміді, такі, наприклад, як бутирамід, ізобутирамід, амід валеріанової кислоти або амід пропіонової кислоти, або  $C_3$ -алкенаміді, такі, наприклад, як метакриламід або амід кротонової кислоти. Переважними індукторами ферментів є метакриламід, бутирамід, ізобутирамід, амід валеріанової кислоти, метакрилнітрил, амід кротонової кислоти, бутиронітрил і ізобутиронітрил. Найбільш переважно використовувати як індуктор ферментів метакрилнітрил.

Як уже вказувалося вище, запропоновані у винаході мікроорганізми залишаються толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 3-молярній концентрації. Подібна здатність зберігати толерантність до ацетонітрилу виявляється в тому, що ферментативна активність залишається стабільною після 1-годинної інкубації з 3-молярним ацетонітрилом у 0,1-молярному калійфосфатному буфері при рН, що дорівнює 7,0, і температурі 20°C, тобто знижується максимум на 10%. Переважні мікроорганізми протягом 1 год залишаються в описаних вище умовах толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 6-молярній концентрації при зменшенні ферментативної активності максимум на 50%. Найбільш переважні мікроорганізми протягом 1 год залишаються в описаних вище умовах толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 9-молярній концентрації при зменшенні ферментативної активності максимум на 70%.

В особливо переважних мікроорганізмів їх ферментативна активність залишається стабільною навіть після інкубації протягом декількох хвилин з 15- і 19-молярним ацетонітрилом (відповідно з чистим ацетонітрилом). Так, зокрема, зниження ферментативної активності при інкубації з 15-молярним ацетонітрилом становить після закінчення 10хв менше 10%.

Запропоновані у винаході мікроорганізми мають високу термостабільність, тобто підвищену стабільність при високих температурах у порівнянні з відомими дотепер мікроорганізмами. Зниження ферментативної активності запропонованих у винаході мікроорганізмів після 1-годинної інкубації в 0,1-молярному калійфосфатному буфері з рН 7,0 при 60°C переважно становить максимум 10%, а зниження ферментативної активності після 2-годинної інкубації у вказаних вище умовах становить максимум 40%.

Під ферментативною активністю в контексті даного винаходу мається на увазі нітрилгідратазна активність, насамперед нітрилгідратазна активність у відношенні 3-ціанпіридину, який служить субстратом.

До переліку інших позитивних властивостей запропонованих у винаході мікроорганізмів належать висока толерантність до 3-ціанпіридину, який є переважним для застосування субстратом, і до продукту, який утворюється з нього, яким є амід нікотинової кислоти, а також низьке  $K_m$ -значення для 3-ціанпіридину. Ще однією позитивною властивістю запропонованих у винаході мікроорганізмів,

яку слід зазначити особливо, є їх здатність акумулювати ацетамід у більш високій концентрації в порівнянні з концентрацією, що відповідає насиченому при 30°C розчину ацетаміду (приблизно 220-230г ацетаміду в 100мл води).

Переважні мікроорганізми належать до роду *Rhodococcus*. До найбільш переважних мікроорганізмів належать штами *Rhodococcus* sp. FZ4 і їх функціонально еквівалентні варіанти і мутанти. Під функціонально еквівалентними варіантами і мутантами при цьому маються на увазі такі, які залишаються толерантними до ацетонітрилу при його присутності принаймні в 3-молярних концентраціях. Особливо переважні "непігментовані" штами *Rhodococcus*, тобто штами, які не мають червоного забарвлення, яке може привести до відповідної зміни кольору цільового продукту. При необхідності подібні штами можна досить легко одержати з пігментують мікроорганізмів у результаті мутагенезу, який індукується впливом УФ-випромінювання або хімічних мутагенів.

Відповідно до Будапештського договору штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 був депонований 11 липня 2000р. у Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, під реєстраційним номером DSM 13597. Цей мікроорганізм на основі його ідентифікаційних даних не вдалося віднести ні до одного відомого дотепер виду *Rhodococcus*, і тому він був виділений у новий вид.

Функціонально еквівалентні варіанти і мутанти штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 можуть виникати в результаті спонтанного мутагенезу або їх можна створювати штучно впливом УФ-випромінювання або хімічних мутагенів. Переважні варіанти і мутанти штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 є "непігментованими", тобто не мають власного червоного забарвлення, яке може привести до відповідної зміни кольору цільового продукту.

Ферментативний екстракт можна одержувати, наприклад, шляхом лізису мікроорганізмів, зокрема за допомогою ультразвуку, пристрою типу "френч-прес" або методу, заснованого на використанні лізоциму.

Запропоновані у винаході ферменти з нітрилгідратазною активністю одержують з описаних вище мікроорганізмів. Переважно при цьому одержувати їх з мікроорганізмів роду *Rhodococcus*, насамперед з мікроорганізмів *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597).

Такі ферменти мають, зокрема, такі властивості:

а) їх  $K_m$ -значення для ацетонітрилу, який є субстратом, становить  $2,84 \pm 1,00$ мМ, а для 3-ціанпіридину, який є субстратом, -  $80,5 \pm 15,0$ мМ, у кожному випадку в 0,05-молярному калійфосфатному буфері з рН 7,0 при 20°C;

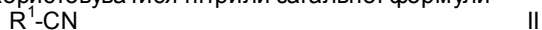
б) оптимальне для них значення рН становить  $6,5 \pm 1,0$  при 20°C у 0,05-молярному калійфосфатному буфері.

Такі ферменти насамперед мають

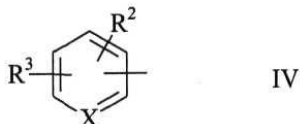
в) природну молекулярну масу, яка становить за даними РХВР-аналізу  $465 \pm 50$ кДа.

Власне процес біотрансформації можна проводити з використанням описаних вище мікроорганізмів, отриманого з цих мікроорганізмів ферментативного екстракту або виділеного ферменту. Переважно проводити біотрансформацію з використанням мікроорганізмів *Rhodococcus* sp. FZ4.

Як субстрати для біотрансформації можуть використовуватися нітрили загальної формули



У цій загальній формулі II замісник  $R^1$  являє собою  $C_{1-6}$ алкільну групу,  $C_{2-6}$ алкенільну групу або групу загальної формули IV



У такій загальній формулі IV X означає атом азоту або групу  $-CH=$ , а замісники  $R^2$  і  $R^3$  незалежно один від одного означають атом водню, атом галогену,  $C_{1-6}$ алкільну групу або  $C_{2-6}$ алкенільну групу.

Як  $C_{1-6}$ алкільна група може використовуватися метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, трет-бутил, ізобутіл, пентил і його ізомери, а також гексил і його ізомери. Як  $C_{2-6}$ алкенільна група може використовуватися, наприклад, вініл, аліл, 1-пропен-1-іл або 1-пропен-2-іл.

Як атом галогену може використовуватися атом A, Cl, Br або I.

Переважаючими представниками нітрilів загальної формули II є ацетонітрил, бутиронітрил, акрилонітрил, пропіонітрил, нітрил кротонової кислоти, 2-ціанпіридин, 3-ціанпіридин, 4-ціанпіридин, бензонітрил, фторбензонітрил, хлорбензонітрил і бромбензонітрил. Переважаючими в більшості випадків субстратами є ацетонітрил і 3-ціанпіридин.

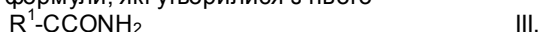
Процес біотрансформації переважно проводять при однократному або безперервному додаванні субстрату. Концентрація використовуваного субстрату залежить від його розчинності, що добре відомо фахівцям у даній галузі техніки.

Процес біотрансформації переважно далі проводити з використанням спочиваючих (які не ростуть) клітин.

Як середовища в процесі біотрансформації можуть використовуватися середовища, які звичайно застосовуються в цих цілях, наприклад низькомолярний фосфатний буфер, HEPES-буфер (HEPES=N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота), цитратний буфер і боратний буфер. Під низькомолярним фосфатним буфером мається на увазі переважно 0,01-0,5-молярний фосфатний буфер, найбільш переважно 0,05-0,25-молярний фосфатний буфер.

Процес біотрансформації переважно проводять при температурі від 5 до 50°C, найбільш переважно при температурі від 20 до 40°C. Переважне значення pH становить від 5 до 10, найбільш переважно від 6 до 7,5.

Після завершення процесу перетворення нітрилу загальної формули II відповідні амідні загальної формули, які утворилися з нього



у якій  $R^1$  має вказані вище значення, можна виділяти, при необхідності після відділення клітин,

переробкою за звичайними методами, такими, наприклад, як кристалізація або розпилювальне сушіння.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування вищеописаних мікроорганізмів, насамперед роду *Rhodococcus*, для знищення відпрацьованого ацетонітрилу.

Ацетонітрил являє собою розчинник, який знаходить застосування, наприклад, у рідинній хроматографії високого розділення (РХВР), і тому після його використання і спрямовування у відхід підлягає утилізації. Максимальна концентрація ацетонітрилу, який після його використання в тих чи інших цілях і спрямування у відхід підлягає утилізації з застосуванням запропонованих у винаході мікроорганізмів, може досягати 19М, що відповідає чистому ацетонітрилу. Переважно, однак, використовувати розчин, відповідно суспензію ацетонітрилу 0,25-15,0-молярної, більш переважно 1-10-молярної, концентрації.

Процес утилізації відпрацьованого ацетонітрилу із застосуванням запропонованих у винаході мікроорганізмів переважно проводити при температурі від 5 до 50°C, більш переважно при температурі від 20 до 40°C. У ході цього процесу значення pH переважно повинно становити від 5 до 10, більш переважно від 6 до 8.

Тривалість переробки відпрацьованого ацетонітрилу, у ході якої ацетонітрил перетворюється в ацетамід, залежить від концентрації утилізованого ацетонітрилу. Так, наприклад, при одержанні розчину або суспензії ацетаміду 9,5-молярної концентрації це перетворення триває приблизно 2 год при значенні pH, що дорівнює 7,0, і температурі близько 20°C.

Ідентифікація штаму FZ4 (DSM 13597)

А) Хемотаксономічні ознаки ("маркери"):

1. Діагностична амінокислота пептидоглікану: мезо-діамінопімелінова кислота.

2. Міколові кислоти: присутні міколові кислоти з ланцюгом довжиною від  $C_{40}$  до  $C_{48}$ .

3. Набір жирних кислот: присутні лінійні, насичені і ненасичені жирні кислоти, а також характерний високий вміст туберкулостеаринової кислоти. На основі набору жирних кислот штаму FZ4 був ідентифікований як такий, що належить до роду *Rhodococcus*.

Б) Звичайні ознаки ("маркери"):

Клітини штаму FZ4 за їх макроскопічним зовнішнім виглядом і морфологією були подібні до *Rhodococcus rhodochrous*. Колонії штаму FZ4 мають світло-рожеве забарвлення (RAL 3022), а в молодих культурах розвивалися гіфи, що галузяться, які розвивалися в палички і коки.

Штаму FZ4 на основі хемотаксономічних і звичайних ознак був ідентифікований як такий, що належить до виду *Rhodococcus rhodochrous*, хоча і з малим коефіцієнтом кореляції.

В) Аналіз перших 500 основ 16S рДНК

Подібність послідовності перших 500 основ 16S рДНК з аналогічною послідовністю штаму *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241, що є типовим представником виду *Rhodococcus rhodochrous*, становить лише 97,7%, а подібність з аналогічною послідовністю іншого еталонного штаму *Rhodococcus rhodochrous* становить 99,1%.

Оскільки подібність між послідовностями перших 500 основ 16S рДНК штаму FZ4 і штаму *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241 становила менше 99,5%, штам FZ4 не вдалося ідентифікувати як такий, який належить до виду *Rhodococcus rhodochrous*. Тому штам FZ4 був виділений у новий вид у роді *Rhodococcus*.

Креслення

На доданих до опису кресленнях показано:

на Фіг.1 - діаграма, яка ілюструє процес біотрансформації ацетонітрилу в ацетамід спочиваючими клітинами штаму *Rhodococcus* sp. FZ4,

на Фіг.2 - діаграма, яка відображає вплив температури на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах і яка дозволяє визначити оптимальне значення температури,

на Фіг.3 - діаграма, яка відображає термостабільність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах,

на Фіг.4 - діаграма, яка відображає вплив величини рН на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах і яка дозволяє визначити оптимальне значення рН,

на Фіг.5 - діаграма, яка відображає рН-стабільність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах,

на Фіг.6 - діаграма, яка відображає толерантність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах до 3-ціанпіридину,

на Фіг.7 - діаграма, яка відображає толерантність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах до амідів нікотинової кислоти,

на Фіг.8 - діаграма, яка відображає вплив концентрації ацетонітрилу на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах у процесі біотрансформації ацетонітрилу в ацетамід,

на Фіг.9 - діаграма, яка відображає вплив концентрації ацетонітрилу на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах,

на Фіг.10 - діаграма, яка відображає залежність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у спочиваючих клітинах від концентрації 3-ціанпіридину,

на Фіг.11 - діаграма, яка відображає взаємозв'язок між відкладеними на логарифмічній шкалі молекулярними масами нітрилгідратази й еталонних білків і відповідним часом утримання при РХВР,

на Фіг.12 - діаграма, яка відображає взаємозв'язок між відкладеними на логарифмічній шкалі молекулярними масами субодиниць нітрилгідратази й еталонних білків і відповідним Rf-значенням при електрофорезі в ПААГ-ДСН,

на Фіг.13 - графік, який відображає залежність активності очищеної нітрилгідратази із штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 від концентрації 3-ціанпіридину,

на Фіг.14 - графік, який відображає залежність активності очищеної нітрилгідратази із штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 від концентрації ацетонітрилу,

на Фіг.15 - графік, який відображає термостабільність очищеної нітрилгідратази із штаму *Rhodococcus* sp. FZ4,

на Фіг.16 - діаграма, на якій представлене оптимальне значення рН для очищеної нітрилгідратази із штаму *Rhodococcus* sp. FZ4, і

на Фіг.17 - діаграма, на якій представлена рН-стабільність очищеної нітрилгідратази із штаму *Rhodococcus* sp. FZ4.

Приклад 1

Визначення нітрилгідратазної активності

Для визначення нітрилгідратазної активності реакційну суміш, яка містить 3-ціанпіридин (1,0М; 1,0мл), калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,5мл) і суспензію клітин (0,5мл), інкубували при перемішуванні і при 20°C протягом 5хв. Реакцію припиняли додаванням НСІ (5М; 0,1мл). Після фільтрації реакційної суміші (через фільтр із розміром пор 0,2мкм) кількість утвореного амідів нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР (колонка Waters Spherisorb 5  $\mu$  ODS2 (4,6×150мм);  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  (10мм; рН 2,8)/ацетонітрил у співвідношенні 9:1 (об./об.); 1мл/хв; 230нм). Загальну активність виражали як кількість утвореного амідів нікотинової кислоти у мкмоль/(хв×мл), а питому активність виражали як кількість утвореного амідів нікотинової кислоти у мкмоль/(хв×мл×ОГ<sub>610нм</sub>).

Приклад 2

Виділення штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597)

Як описано в [Arch. Microbiol. 170 (1998), стор.85-90], штам *Rhodococcus* sp. YH3-3 (TPU 3453) метаболізує 3-піридинільдоксим через 3-ціанпіридин і амід нікотинової кислоти до нікотинової кислоти. У цьому випадку альдоксимдегідратазну активність, а також нітрилгідратазну й амідазну активність штаму *Rhodococcus* sp. YH3-3 (TPU 3453) індукували різними альдоксимами і нітрилами.

Різні зразки ґрунту вносили в збагачувальне середовище, склад якого вказаний нижче в таблиці 1, і інкубували протягом 7-10 днів при 37°C. Отримані таким шляхом культури пересівали в середовище того ж складу і інкубували ще протягом 7-10 днів при 37°C. Цю процедуру повторювали тричі. Потім культури розбавляли і висівали на чашки. Після 5-денної інкубації вмісту чашок при 37°C одержували окремі колонії. Ці окремі колонії досліджували відповідно до прикладу 1 на наявність нітрилгідратазної активності. Таким шляхом виділили штам *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597). Замість 3-піридинальдоксиму як джерело вуглецю можна також використовувати такі нітрили, як ацетонітрил, пропіонітрил, бутиронітрил, нітрил кротонової кислоти, нітрил адипінової кислоти і нітрил маленової кислоти.

Таблиця 1

Склад збагачувального середовища

Компоненти	Концентрація [г/л]
3-піридинальдоксим	3,0 або 1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,01
дріжджовий екстракт	0,2

Об'єм середовища додаванням води доводять до 1л (рН 7,0).

## Приклад 3

Вплив кофакторів на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у процесі вирощування

Штам *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597) вносили в середовище для вирощування попередніх культур, склад якого вказаний у таблиці 2, і при струшуванні інкубували протягом 1-2 днів при 28°C. Отриману попередню культуру пересівали в базальне середовище, склад якого вказаний у таблиці 3 і яке містило або CoCl<sub>2</sub>, або FeSO<sub>4</sub>, і при струшуванні інкубували протягом 2-3 днів при 28°C. Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1. Отримані результати наведені в таблиці 4. Нітрилгідратазна активність виявлялася тільки при культивуванні штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у присутності кобальту.

Таблиця 2

Склад середовища для виношування попередніх культур

Компоненти	Концентрація [г/л]
пептон	5,0
м'ясний екстракт	5,0
NaCl	2,0
дріжджовий екстракт	0,5

Об'єм середовища додаванням води доводять до 1л (рН 7,0).

Таблиця 3

Склад базального середовища

Компоненти	Концентрація [г/л]
дріжджовий екстракт	2,0
пептон	0,2
L-глутамат, натрієва сіль	15,0
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O (або FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O)	0,004
амід кротонової кислоти	5,0

Об'єм середовища додаванням води доводять до 1л (рН 6,8).

Таблиця 4

Вплив кофакторів на нітрилгідратазну активність штаму в процесі вирощування

Кофактор	Ріст [ОГ <sub>610нм</sub> ]	Загальна активність [мкмоль/(хв×мл)]	Питома активність [мкмоль/(хв×мл×ОГ <sub>610нм</sub> )]
FeSO <sub>4</sub>	2,86	0,989	0,346
CoCl <sub>2</sub>	2,79	38,1	13,1

## Приклад 4

Вплив індукторів на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у процесі вирощування

Штам *Rhodococcus* sp. FZ4 (DSM 13597) вносили в середовище для вирощування попередніх культур, склад якого вказаний у таблиці 2, і при струшуванні інкубували протягом 1-2 днів при 28°C. Отриману попередню культуру пересівали в культуральне середовище, склад якого вказаний у таблиці 5 і яке містило різні індуктори, і при струшуванні інкубували протягом 3 днів при 28°C. Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1. Отримані результати наведені в таблиці 5. Експерія нітрилгідратази штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 відбувалася в процесі вирощування тільки в присутності одного індуктора.

Таблиця 5

Склад культурального середовища

Компоненти	Концентрація [г/л]
дріжджовий екстракт	1,0
цитрат натрію	10,0
солодовий екстракт	15,0
індуктор	0,2% (мас/об.)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,015

Об'єм середовища додаванням води доводять до 1л (рН 7,0).

Таблиця 6

Вплив індукторів на нітрилгідратазну активність

Індуктор	Ріст [ОГ <sub>610нм</sub> ]	Загальна активність [мкмоль/(хв×мл)]	Питома активність [мкмоль/(хв×мл×ОГ <sub>610нм</sub> )]
1	2	3	4
метакриламід	4,55	569	125
ізобутирамід	3,55	387	109
бутирамід	4,7	344	73,2
метакрилнітрил	4,61	330	71,5

Продовження таблиці 6

1	2	3	4
амід кротонової кислоти	9,32	558	59,9
бутиронітрил	5,26	307	58,4
амід валеріано- вої кислоти	5,61	322	57,5
ізобутиронітрил	5,24	273	52,1
нітрил кротоно- вої кислоти	8,24	407	49,4
амід пропіоно- вої кислоти	5,17	149	28,7
валеронітрил	3,70	120	32,4
нітрил ізокапро- нової кислоти	4,72	134	28,5
ізовалеронітрил	3,22	74,7	23,2
нітрил капроно- вої кислоти	4,54	104	23,0
пропіонітрил	4,72	95,8	20,3
акрилоамід	5,17	60,5	11,7
3-пентеннітрил	4,62	62	13,4
ε-капролактамі	4,44	40,3	9,08
бензонітрил	5,62	40,3	7,17
амід піколінової кислоти	3,80	26,1	6,87
-	4,2	27,7	6,59
ціанацетамід	4,75	30,9	6,50
ацетамід	4,37	21,6	4,98
ацетонітрил	4,46	18,4	4,13
3-ціанпіридин	5,54	12,3	2,21
амід ізоникоти- нової кислоти	5,03	10,9	2,17
бензамід	3,88	8,24	2,12
акрилонітрил	3,27	5,91	1,81
амід нікотинової кислоти	3,55	4,94	1,39
сечовина	6,16	5,66	0,918

## Приклад 5

Вирощування штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Штам *Rhodococcus* sp. FZ4 вносили в середовище для вирощування попередніх культур, склад якого вказаний у таблиці 2, і при струшуванні інкубували протягом 1-2 днів при 28°C. Отриману попередню культуру пересівали в культуральне середовище, склад якого вказаний у таблиці 5 і яке містило як індуктор метакриламід у концентрації 6г/л, і при струшуванні інкубували протягом 3 днів при 28°C. Через 48год додатково додавали метакриламід (0,2% (об./об.)).

В описаних нижче прикладах 6-13 використовували спочиваючі клітини штаму *Rhodococcus* sp. FZ4.

## Приклад 6

Субстратна специфічність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 при використанні різних субстратів визначали відповідно до прикладу 1, застосовуючи замість 3-ціанпіридину відповідний субстрат і відповідно змінюючи умови проведення РХВР залежно від використовуваного субстрату.

Дані про субстратну специфічність нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 у порівнянні із субстратною специфічністю нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus rhodochrous* J1 наведені в таблиці 7.

Таблиця 7

Порівняння субстратної специфічності нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 і штаму *Rhodococcus rhodochrous* J1

Субстрат	Відносна активність [%]	
	<i>Rhodococcus</i> sp. FZ4	штаму <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1
ацетонітрил	646	0 (нітрилгідратаза А) 115 (нітрилгідратаза В)
акрилонітрил	498	478
бутиронітрил	466	26
пропіонітрил	412	435
3-ціанпіридин	100	100
4-ціанпіридин	98,4	70
нітрил кротоно- вої кислоти	92,1	78
бензонітрил	41,7	27
2-ціанпіридин	39,3	45
м- хлорбензонітрил	39,3	43
п- хлорбензонітрил	8,25	13
метакрилонітрил	3,64	87
о- хлорбензонітрил	0	2,8

## Приклад 7

Оптимальна температура для нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 і її термостабільність

Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1 при різних температурах в інтервалі від 20 до 70°C. Оптимальне значення температури для нітрилгідратазної активності припадало на 60°C (Фіг.2).

Для визначення термостабільності нітрилгідратазної активності суспензію клітин інкубували протягом 15хв при різних температурах в інтервалі від 40 до 70°C. Після цього нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1 при 20°C. Після 15-хвилинної інкубації при температурах в інтервалі від 40 до 60°C нітрилгідратазна активність відповідала вихідному рівню (Фіг.3).

## Приклад 8

Оптимальне значення рН для нітрилгідратазної активності штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 і її рН-стабільність

Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1 при різних значеннях рН в інтервалі від 3 до 12 з використанням різних буферів (0,1-молярних). Оптимальні значення рН для нітрилгідратазної активності припадали на інтервал значень від 6 до 7 (Фіг.4).

Для визначення рН-стабільності нітрилгідратазної активності суспензію 20 клітин інкубували при 20°C протягом 24 год при різних значеннях рН в інтервалі від 4 до 10. Після цього суспензію клітин центрифугували. Відділені клітини промивали і ресуспендували в калійфосфатному буфері (0,1М, рН 7,0). Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1. Після 24-годинної інкубації при різних значеннях рН в інтервалі від 5 до 10 нітрилгідратазна активність приблизно відповідала вихідному рівню (Фіг.5).

#### Приклад 9

Вплив концентрації 3-ціанпіридину на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Суспензію клітин інкубували протягом 60хв при 20°C у присутності різних концентрацій 3-ціанпіридину в інтервалі від 0 до 10% (мас/об.). Потім клітини відокремлювали, промивали і ресуспендували в калійфосфатному буфері (0,1М, рН 7,0). Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1. Після 60-хвилинної інкубації в присутності різних концентрацій 3-ціанпіридину в інтервалі від 0 до 20% (мас/об.) нітрилгідратазна активність приблизно відповідала вихідному рівню (Фіг.6).

#### Приклад 10

Вплив концентрації амідю нікотинової кислоти на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Суспензію клітин інкубували протягом 24 год при 20°C у присутності різних концентрацій амідю нікотинової кислоти в інтервалі від 0 до 20% (мас/об.). Потім клітини відокремлювали, промивали і ресуспендували в 0,1-молярному калійфосфатному буфері (0,1М, рН 7,0). Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1. Після 24-годинної інкубації в присутності різних концентрацій амідю нікотинової кислоти в інтервалі від 0 до 20% (мас/об.) нітрилгідратазна активність приблизно відповідала вихідному рівню (Фіг.7).

#### Приклад 11

Визначення  $K_m$ -значення для 3-ціанпіридину в нітрилгідратази штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Реакційну суміш, яка містить 3-ціанпіридин (0,1-1,0М; 1,0-1,8мл), водний розчин NaCl (0,85%-ний (мас/об.); 0,7-0,1мл), калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,3мл) і суспензію клітин (0,01мл), при струшуванні інкубували протягом 10хв при

30°C. Загальний об'єм реакційної суміші становив залежно від концентрації 3-ціанпіридину від 2,0 до 2,2мл. Реакцію припиняли додаванням HCl (2М; 0,1мл). Після центрифугування реакційної суміші (при 12000об/хв протягом 5хв) кількість утвореного амідю нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. Визначене таким шляхом  $K_m$ -значення становило 160ММ (Фіг.10).

#### Приклад 12

Порівняння рівнів нітрилгідратазної активності штаму *Rhododoccus* sp. FZ4 з рівнями нітрилгідратазної активності відомих мікроорганізмів *Amycolatopsis* sp. NA40, *Rhodococcus* sp. GF270 і *Rhodococcus rhodochrous* J1

$K_m$ -значення для 3-ціанпіридину, який служить субстратом, в нітрилгідратазній активності штамів *Rhododoccus* sp. FZ4, *Rhodococcus* sp. GF270 (DSM 12211, [WO 99/05306]), *Amycolatopsis* sp. NA40 (DSM 11617, [WO 99/05306]) і *Rhodococcus rhodochrous* J1 визначали відповідно до прикладу 11 з використанням відповідного мікроорганізму.

$K_m$ -значення, отримані для штамів *Amycolatopsis* sp. NA40 і *Rhodococcus* sp. FZ4, менше значень, отриманих для інших мікроорганізмів (таблиця 8).

Таблиця 8

Порівняння  $K_m$ -значень для 3-ціанпіридину, який служить субстратом

$K_m$ [ММ]			
<i>Rhododoccus</i> sp. FZ4	<i>Rhodococcus</i> sp. GF270	<i>Amycolatopsis</i> sp. NA40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1
160	>200	41,7	200

Термостабільність нітрилгідратазної активності штамів *Rhododoccus* sp. FZ4, *Rhodococcus* sp. GF270, *Amycolatopsis* sp. NA40 і *Rhodococcus rhodochrous* J1 визначали відповідно до прикладу 7 з використанням відповідного мікроорганізму і вказаних у таблиці 9 умов інкубації. Нітрилгідратазна активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4 виявляла найвищу термостабільність у порівнянні з нітрилгідратазною активністю інших мікроорганізмів.



Таблиця 9

## Порівняння термостабільності нітрилгідратазної активності

Умови інкубації	Відносна активність [%]			
	Rhododococcus sp. FZ4	Rhodococcus sp. GF270	Amycolatopsis sp. NA40	Rhodococcus rhodochrous J1
15хв при				
50°C	100	100	н.в. <sup>a</sup>	100
60°C	93	95	н.в. <sup>a</sup>	80
70°C	2	5	н.в. <sup>a</sup>	0
60хв при				
20°C	100	100	100	н.в. <sup>a</sup>
30°C	100	100	95	н.в. <sup>a</sup>
40°C	100	100	80	н.в. <sup>a</sup>
50°C	100	100	32	н.в. <sup>a</sup>
60°C	100	89	0	н.в. <sup>a</sup>
70°C	6	0	0	н.в. <sup>a</sup>
60°C протягом				
0хв	100	100	н.в. <sup>a</sup>	н.в. <sup>a</sup>
30хв	100	67-80	н.в. <sup>a</sup>	н.в. <sup>a</sup>
60хв	92-100	52-68	н.в. <sup>a</sup>	н.в. <sup>a</sup>
120хв	72-87	29-47	н.в. <sup>a</sup>	н.в. <sup>a</sup>

Примітка: <sup>a</sup>не визначали.

Вплив концентрації 3-ціанпіридину на нітрилгідратазну активність штамів Rhododococcus sp. FZ4, Rhodococcus sp. GF270, Amycolatopsis sp. NA40 і Rhodococcus rhodochrous J1 визначали відповідно до прикладу 9 з використанням відпові-

дного мікроорганізму і вказаних у таблиці 10 концентрацій 3-ціанпіридину. Нітрилгідратазна активність штамів Rhodococcus sp. FZ4 і Rhodococcus sp. GF270 виявляла найвищу толерантність до 3-ціанпіридину.

Таблиця 10

## Порівняння впливу різних концентрацій 3-ціанпіридину на нітрилгідратазну активність

3-ціанпіридин [% (мас/об.)]	Відносна активність [%]			
	Rhododococcus sp. FZ4	Rhodococcus sp. GF270	Amycolatopsis sp. NA40	Rhodococcus rhodochrous J1
0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
2,5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	74 <sup>o</sup>	н.в. <sup>b</sup>
5,0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	56 <sup>o</sup>	86 <sup>b</sup>
7,5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	47 <sup>o</sup>	н.в. <sup>b</sup>
10,0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>	63 <sup>b</sup>

Примітки: <sup>a</sup>інкубація протягом 60хв,  
<sup>b</sup>інкубація протягом 15хв,  
<sup>o</sup>не визначали.

Вплив концентрації амідю нікотинової кислоти на нітрилгідратазну активність штамів Rhodococcus sp. FZ4, Rhodococcus sp. GF270, Amycolatopsis sp. NA40 і Rhodococcus rhodochrous J1 визначали відповідно до прикладу 9 з використанням відповідного мікроорганізму і вказаних у таб-

лиці 11 концентрацій амідю нікотинової кислоти. Нітрилгідратазна активність штамів Rhodococcus sp. FZ4 і Rhodococcus sp. GF270 виявляла найвищу толерантність до амідю нікотинової кислоти (таблиця 11).

Таблиця 11

Порівняння впливу різних концентрацій амідів нікотинової кислоти на нітрилгідратазну активність

Амід нікотинової кислоти [% (мас/об.)]	Відносна активність [%]			
	Rhodococcus sp. FZ4	Rhodococcus sp. GF270	Amycolatopsis sp. NA40	Rhodococcus rhodochrous J1
0	100	100	100	н.в. <sup>a</sup>
10	100	100	55	н.в. <sup>a</sup>
20	100	100	0	н.в. <sup>a</sup>
30	100	100	0	н.в. <sup>a</sup>

Примітка: <sup>a</sup> не визначали.

#### Приклад 13

Біотрансформація 3-ціанпіридину в амід нікотинової кислоти штамом *Rhodococcus* sp. FZ4

Розчин 3-ціанпіридину додавали 42 порціями (42×0,52г = 21,8г; 0,21моля) до попередньо приготовленої суміші, яка містить суспензію клітин (13,7мг у перерахунку на суху масу клітин, 4мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 6,0; 16мл). Кожну наступну порцію 3-ціанпіридину додавали до реакційної суміші після кількісного перетворення в ній 3-ціанпіридину в амід нікотинової кислоти. Реакційна суміш залишалася в ході реакції густою, відповідно щільною. Загальна кількість утвореного амідів нікотинової кислоти становила 25,7г (кількісний вихід).

#### Приклад 14

Біотрансформація ацетонітрилу в ацетамід штамом *Rhodococcus* sp. FZ4

До реакційної суміші, яка містить калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 4,5мл) і суспензію клітин (4,88мг у перерахунку на суху масу клітин; 0,5мл), протягом 80хв при 20°C по краплях додавали ацетонітрил (5мл; 95ммоль). Наступна реакція відбувалася при 20°C і при струшуванні. Утворення ацетаміду в ході реакції відслідковували за допомогою РХВР (колонка Waters Spherisorp 5 μ ODS2 (4,6×150мм); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10мм; рН 2,5)/ацетонітрил у співвідношенні 99/1(об./об.); 1,0мл/хв; 210нм). Протягом 120хв утворювалося 6,14г (кількісний вихід) ацетаміду, який накопичувався в реакційно-мусередовищі (Фіг.1).

#### Приклад 15

Вплив концентрації ацетонітрилу на нітрилгідратазну активність штамів *Rhodococcus* sp. FZ4 у процесі біотрансформації ацетонітрилу в ацетамід

Реакційну суміш, яка містить ацетонітрил (0,2-19,0М; 1,0-1,6мл), водний 20 розчин NaCl (0,85%-ний (мас/об.); 0,6-0,0мл), калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,3мл) і суспензію клітин (0,1мл), при струшуванні інкубували протягом 10хв при 20°C. Загальний об'єм реакційної суміші становив 2,0мл. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Потім реакційну суміш центрифугували (при 12000об/хв протягом 5хв) і за допомогою РХВР відповідно до прикладу 14 визначали кількість утвореного ацетаміду.

При концентрації ацетонітрилу в інтервалі від 0,1 до 15М нітрилгідратазна активність залишалася практично постійною (Фіг.8).

#### Приклад 16

Вплив концентрації ацетонітрилу на нітрилгідратазну активність штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Клітини протягом 1год інкубували в присутності ацетонітрилу (0,0-15,0М) у калійфосфатному буфері (0,1М, рН 7,0) при 20°C. Потім суспензію клітин центрифугували (при 12000об/хв протягом 5хв) і клітини ресуспендували у водному розчині NaCl (0,85%-ному (мас/об.)). Далі реакційну суміш, яка містить цю суспензію клітин (0,1мл), 3-ціанпіридин (0,5М; 1,0мл), водний розчин NaCl (0,85%-ний (мас/об.); 0,6мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,3мл), при струшуванні інкубували протягом 5хв при 30°C. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Реакційну суміш центрифугували (при 12000об/хв протягом 5хв) і за допомогою РХВР відповідно до прикладу 14 визначали кількість утвореного ацетаміду.

Після 1-годинної інкубації в присутності ацетонітрилу в інтервалі концентрацій від 0 до 3М нітрилгідратазна активність залишалася практично незмінною. Після 1-годинної інкубації в присутності 6-молярного ацетонітрилу нітрилгідратазна активність усе ще становила 60% від вихідного рівня. Після 1-годинної інкубації в присутності 9-молярного ацетонітрилу нітрилгідратазна активність усе ще становила порядку 35% від вихідного рівня (Фіг.9).

#### Приклад 17

Створення непігментованих мутантів штаму *Rhodococcus* sp. FZ4

Штам *Rhodococcus* sp. FZ4 вносили в середовище типу "живильного бульйону" (50мл) і інкубували при струшуванні і при 28°C до досягнення оптичної густини ОГ<sub>610нм</sub>, що дорівнює 6,29. Потім цю попередню культуру (10мл) пересівали на середовище типу "живильного бульйону" (25мл) і при струшуванні інкубували при 28°C до досягнення оптичної густини ОГ<sub>610нм</sub> що дорівнює 1,90. Отриману таким шляхом культуру (10мл) центрифугували (при 8000об/хв протягом 5хв). Надосадову рідину відкидали, а осад, який містить клітини, суспендували в забуференому фосфатом розчині кухонної солі. Отриману суспензію клітин центрифугували (при 8000об/хв протягом 5хв). Надосадову рідину відкидали, а осад, який містить клітини, суспендували в забуференому фосфатом розчині кухонної солі (5мл). Цю суспензію клітин переносили в скляну чашку Петрі (діаметром 90мм). Далі клітини протягом 17хв опромінювали УФ-лампкою (15Вт, 254нм) з відстані 25см. Після цього клітини при струшуванні інкубували протя-

гом 4 днів при 28°C у середовищі типу "живильного бульйону" подвійної концентрації. Отриману таким шляхом культуру розбавляли в 100 разів і 100-мікролітрові аліквоти такої розведеної культури висівали на агар для чашкового підрахунку і інкубували при 28°C. У кожній чашці виростало майже по 150 окремих колоній. Чашки поміщали в доступне для денного світла місце з метою індукувати утворення червоних пігментів. Колонії непігментованих мутантів можна було легко відрізнити від колоній забарвлених мутантів і колоній мікроорганізмів дикого типу, які мають червоне забарвлення.

#### Приклад 18

Очищення нітрилгідратази з *Rhodococcus* sp. FZ4

Штам *Rhodococcus* sp. FZ4 вирощували відповідно до прикладу 3 у 2-літровому ферментері. Отриману культуру центрифугували й осад, який містить клітини, ресуспендували у водному розчині NaCl (0,85%-ному (мас/об.)). Далі суспензію клітин переносили в калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0), який містить масляну кислоту (44мМ), і обробляли ультразвуком. Залишки клітин, які утворилися в результаті їх руйнування, видаляли центрифугуванням. Надосадову рідину використовували для очищення нітрилгідратази відповідно до наведених в таблиці 12 умов. Нітрилгідратазну активність визначали відповідно до прикладу 1, однак замість суспензії клітин використовували відповідні екстракти.

Таблиця 12

Очищення нітрилгідратази з *Rhodococcus* sp. FZ4

Стадія очищення	Вміст білка [мг]	Загальна активність [мкмоль/хв]	Питома активність [мкмоль/(хв×мг)]
безклітинний екстракт	335	5881	17,6
осадження (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	198	6087	28,4
DEAE-сефацел	73,0	3553	48,7
бутил-Тоуорепарл	66,2	2035	30,7
феніл-сефароза	26,2	890	34,0

#### Приклад 19

Визначення молекулярної маси очищеної нітрилгідратази

Молекулярну масу визначали за допомогою РХВР (колонка TSK gel G 300 SW (0,75×60см); калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,5) і хлорид калію (0,2М); 0,7мл/хв; 280нм). Молекулярна маса нітрилгідратази становила 465кДа (Фіг.11). Нітрилгідратаза складається з α-субодиниці з молекулярною масою 27,7 кДа і β-субодиниці з молекулярною масою 31,2кДа (Фіг.12).

#### Приклад 20

Термостабільність очищеної нітрилгідратази

Розчин, який містить розчин нітрилгідратази (0,697мкмоль/хв; 0,025мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,475мл), інкубували протягом 60хв при різних температурах в інтервалі від 20 до 70°C. Після цього розчин охолоджували за допомогою льодяної бані до 20°C і додавали 3-ціанпіридин (0,5М; 0,500мл). Потім реакційну суміш інкубували протягом 10хв при 20°C. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Кількість утвореного аміду нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. Після 60-хвилинної інкубації при температурах вище 40°C нітрилгідратазна активність значно знижувалася, при цьому після 60-хвилинної інкубації при 50°C нітрилгідратазна активність становила лише близько 25% від вихідного рівня (Фіг.15).

#### Приклад 21

Оптимальне значення рН для очищеної нітрилгідратази

Реакційну суміш, яка містить 3-ціанпіридин (0,5М; 0,500мл), розчин нітрилгідратази (0,697мкмоль/хв; 0,025мл) і різні буфери з рН в інтервалі від 4 до 11 (0,1М; 0,0475мл), інкубували

протягом 10хв при 20°C. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Кількість утвореного аміду нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. Оптимальне значення рН для нітрилгідратази припадало на інтервал від 6,0 до 6,5 (Фіг.16).

#### Приклад 22

рН-стабільність очищеної нітрилгідратази

Розчин, який містить розчин нітрилгідратази (8,36мкмоль/хв; 0,47мл), різні буфери з рН в інтервалі від 4,0 до 11,0 (0,3М; 0,10мл) і дистильовану воду (0,03мл), інкубували протягом 30хв при 20°C. Потім реакційну суміш, яка містить аліквотну кількість інкубованого на попередній стадії розчину нітрилгідратази (0,05мл), 3-ціанпіридин (0,5М; 0,5мл) і відповідний буфер (0,1М; 0,45мл), інкубували протягом 10хв при 20°C. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Кількість утвореного аміду нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. Після 60-хвилинної інкубації при значенні рН в інтервалі від 6 до 8 нітрилгідратазна активність приблизно відповідала вихідному рівню (Фіг.17).

#### Приклад 23

Субстратна специфічність очищеної нітрилгідратази

Реакційну суміш, яка містить розчин нітрилгідратази (0,695мкмоль/хв; 0,025мл), різні субстрати (0,500мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,475мл), інкубували протягом 5-10хв при 20°C. Субстрати використовували в концентраціях від 0,015 до 0,250М. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Кількість утвореного аміду кислоти визначали за допомогою РХВР. Отримані 20 результати наведені в таблиці 13. Серед усіх протестованих

субстратів найвищу активність нітрилгідратаза

виявляє у відношенні ацетонітрилу.

Таблиця 13

Субстратна специфічність очищеної нітрилгідратази

Субстрат	Концентрація [М]	Відносна активність [%]
ацетонітрил	0,2	1008
акрилонітрил	0,2	774
пропіонітрил	0,2	693
бутиронітрил	0,2	578
нітрил кротонової кислоти	0,2	114
3-ціанпіридин	0,25	100 <sup>a</sup>
4-ціанпіридин	0,125	92,8
бензонітрил	0,015	75,6
м-хлорбензонітрил	0,015	66,5
2-ціанпіридин	0,125	36,7
п-хлорбензонітрил	0,015	8,31
метакриламід	0,2	1,39
о-хлорбензонітрил	0,015	0

Примітка:

<sup>a</sup>загальна активність: 4164мкмоля/(хвхл).

## Приклад 24

Вплив потенційних інгібіторів на очищену нітрилгідратазу

Розчин, який містить розчин нітрилгідратази (0,695мкмоля/хв; 0,025мл), калійфосфатний буфер (0,1М, pH7,0; 0,475мл), дистильовану воду (0,150мл) і різні потенційні інгібітори (0,100мл), інкубували протягом 5хв при 20°C. Після цього додавали 3-ціанпіридин (1,0М; 0,250мл). Концентрація інгібіторів у реакційній суміші становила 1,0мМ. Реакційну суміш інкубували протягом 10хв при 20°C. Реакцію припиняли додаванням MeOH. Кількість утвореного аміді нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. Отримані результати представлені в таблиці 14. Серед усіх протестованих потенційних інгібіторів найбільшу інгібуючу дію виявляють гідроксиламін і ціанід калію.

Таблиця 14

Вплив потенційних інгібіторів на очищену нітрилгідратазу

Потенційний інгібітор	Відносна активність [%]
п-хлормеркурбензойна кислота <sup>a</sup>	187
тирон	114
фенілметансульфоніл фторид	110
1,10-фенантролін	106
сечовина	106
дитіотреїтол	103

ЕДТК <sup>o</sup>	100
-	100 <sup>b</sup>
цистеамін	99,1
8-гідроксихінолін	97,8
2,2'-біпіридил	97,8
йодацетат	96,7
N-етилmaleїнімід	95,3
азид натрію	93,5
5,5'-дитіобіс(2-нітробензойна кислота) <sup>a</sup>	93,4
діетилдитіокарбамат	93,3
D-циклосерин	86,3
фенілгідазин	84,6
2-меркаптоетанол	76,3
гідроксиламін	1,34
ціанід калію	0

Примітки:

<sup>a</sup>0,1мМ,<sup>o</sup>етилендіамінтетраоцтова кислота,<sup>b</sup>загальна активність: 3776мкмолів/(хвхмл).

## Приклад 25

Вплив іонів металів на активність очищеної нітрилгідратази

Вплив іонів металів на активність очищеної нітрилгідратази визначали відповідно до прикладу 24, але з використанням іонів металів замість потенційних інгібіторів. Концентрація іонів металів у реакційній суміші становила 1,0мМ. Отримані результати представлені в таблиці 15. Серед усіх протестованих іонів металів інгібуючу дію виявляють лише катіони срібла і двозарядні катіони ртуті.

Таблиця 15

Вплив іонів металів  
на активність очищеної нітрилгідратази

Іони металів	Відносна активність [%]
CuSO <sub>4</sub>	177
MnCl <sub>2</sub>	123
NiCl <sub>2</sub>	123
ZnSO <sub>4</sub>	121
FeSO <sub>4</sub>	113
CaCl <sub>2</sub>	113
CoCl <sub>2</sub>	ПО
FeCl <sub>3</sub>	105
-	100 <sup>a</sup>
AgNO <sub>3</sub>	0
HgCl <sub>2</sub> <sup>b</sup>	0

Примітки:

<sup>a</sup> загальна активність: 3375мкмолів/(хв×мл),

<sup>b</sup> 0,1мМ.

Приклад 26

Визначення K<sub>m</sub>-значення для 3-ціанпіридину в очищеної нітрилгідратази

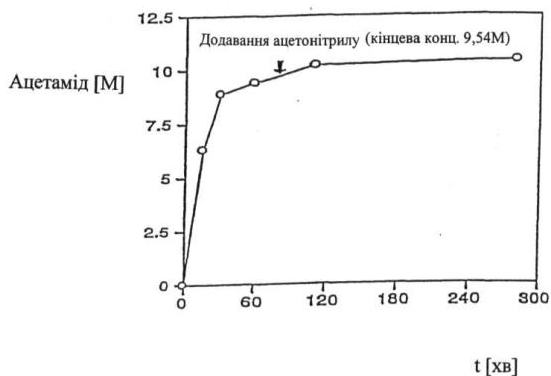
До розчину, який містить розчин нітрилгідратази (0,0697мкмоль/хв; 0,025мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,475мл), додавали 3-ціанпіридин у різних концентраціях (3,1-800мМ; 0,500мл). Реакційну суміш інкубували протягом 10хв при 20°С. Реакцію припиняли додаванням метанолу і кількість утвореного амиду нікотинової кислоти визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 1. K<sub>m</sub>-значення для 3-ціанпіридину становило 80,5мМ (Фіг.13).

Приклад 27

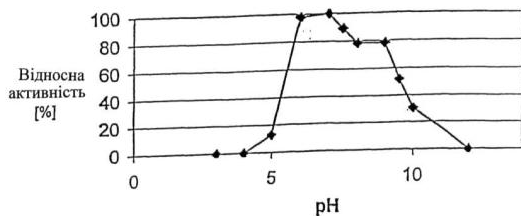
Визначення K<sub>m</sub>-значення для ацетонітрилу в очищеної нітрилгідратази

До розчину, який містить розчин нітрилгідратази (0,0697мкмоль/хв; 0,025мл) і калійфосфатний буфер (0,1М, рН 7,0; 0,475мл), додавали ацетонітрил у різних концентраціях (2,5-80мМ; 0,500мл). Реакційну суміш інкубували протягом 10хв при 20°С. Реакцію припиняли додаванням метанолу і кількість утвореного ацетаміду визначали за допомогою РХВР відповідно до прикладу 14. K<sub>m</sub>-значення для ацетонітрилу становило 2,84мМ (Фіг.14).

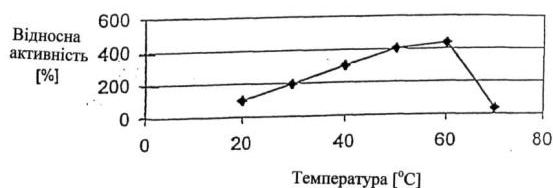
Фіг. 1



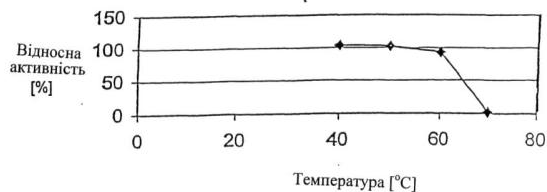
Фіг. 4: Оптимальне значення рН



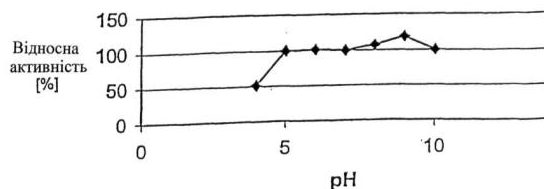
Фіг. 2: Оптимальна температура



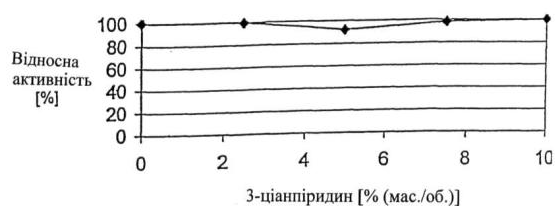
Фіг. 3: Термостабільність



Фіг. 5: рН-Стабільність



Фиг. 6

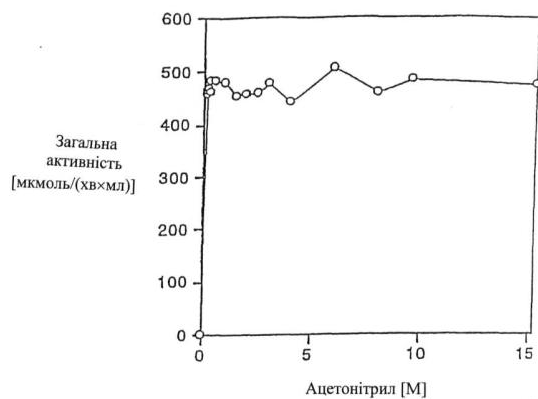


Фиг. 7

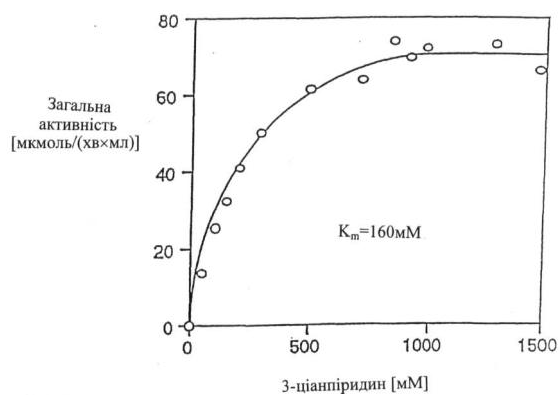


Фиг. 9

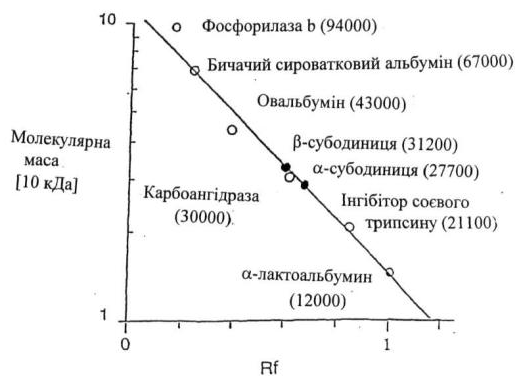
Фиг. 8



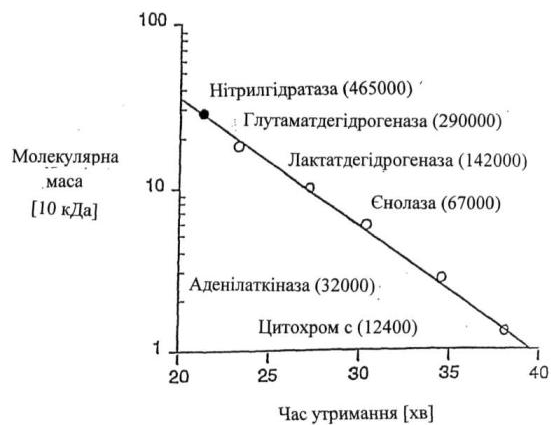
Фиг. 10



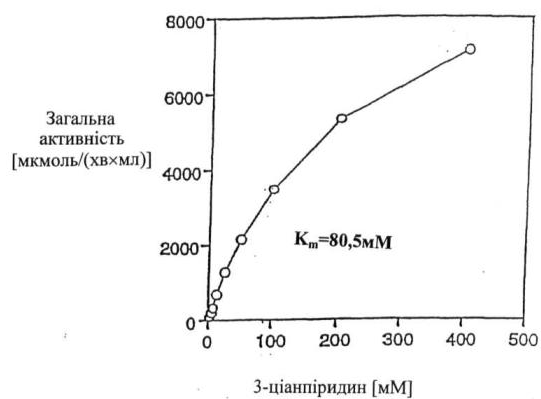
Фиг. 12



Фиг. 11

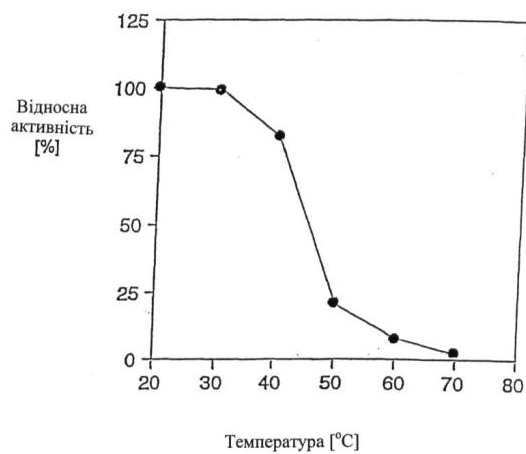
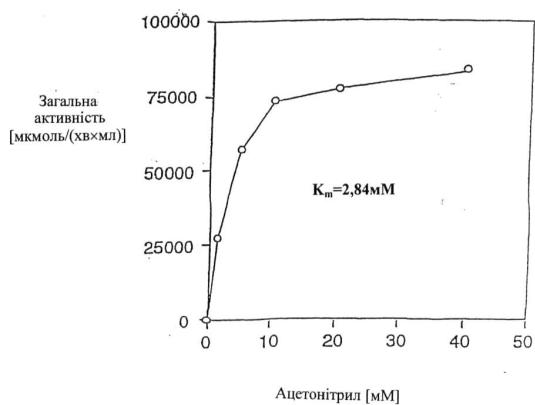


Фиг. 13



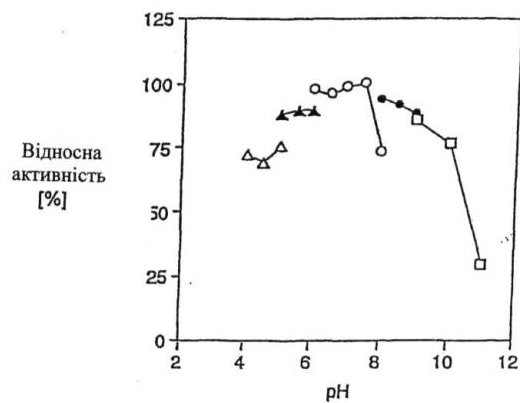
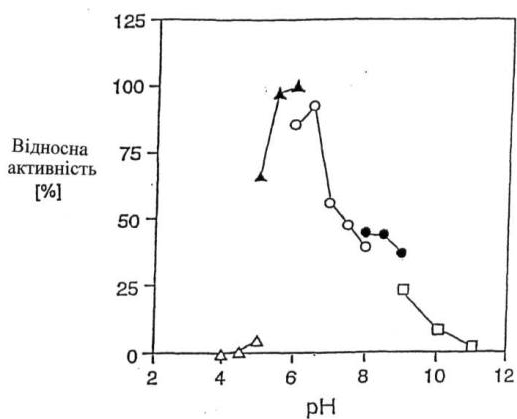
Фіг. 15

Фіг. 14



Фіг. 17: рН-Стабільність

Фіг. 16: Оптимальне значення рН



—△— Ацетатний буфер  
 —▲— Цитратний буфер  
 —○— Калійфосфатний буфер  
 —●— Трис-НСІ-буфер  
 —□— Натрійгідрокарбонатний буфер

—△— Ацетатний буфер  
 —▲— Цитратний буфер  
 —○— Калійфосфатний буфер  
 —●— Трис-НСІ-буфер  
 —□— Натрійгідрокарбонатний буфер