

Национальная академия наук Беларуси

Государственное научное учреждение «Институт микробиологии»

УДК 573.6: 577.158: 579.66

АХРАМОВИЧ Татьяна Игоревна

**ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ЭПОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

03.00.23 – Биотехнология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

МИНСК – 2002

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и биоэкологии
учреждения образования «Белорусский государственный
технологический университет»

Научный руководитель – кандидат химических наук, доцент
Леонтьев В.Н., кафедра биотехнологии и биоэкологии
УО «Белорусский государственный технологический университет»

Научный консультант – кандидат биологических наук, доцент
Гриц Н.В., заведующий кафедрой биотехнологии и биоэкологии
УО «Белорусский государственный технологический университет»

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
член-корреспондент НАНБ Зинченко А.И., заведующий лабораторией
компонентов нуклеиновых кислот ГНУ «Институт микробиологии НАН
Беларуси»;

доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Шкуматов В.М., заведующий лабораторией биохимии лекарственных
препаратов НИИ физико-химических проблем Белорусского государст-
венного университета

Оппонирующая организация – Белорусский государственный
университет

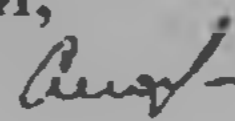
Защита диссертации состоится 29 марта 2002 г. в 13⁰⁰ часов на засе-
дании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при ГНУ «Институт мик-
робиологии НАН Беларуси» по адресу: 220141, г.Минск, ул.Купревича, 2.
Тел. (017) 264-47-18, fax (017) 264-47-66.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт
микробиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан

« ____ » февраля 2002 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций,
канд. биол. наук



Л.И.Стефанович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Интерес к эпоксидным соединениям обусловлен тем, что эпоксидный цикл легко раскрывается с образованием либо полимерных продуктов, находящих широкое промышленное применение, либо бифункциональных оптически активных соединений, многие из которых обладают биологической активностью. Эпоксидные соединения применяются в производстве этилен- и пропиленгликолей, полиэтилен- и полипропиленгликолей, различных сополимеров, пенополиуретанов, ПАВ, синтетических смазочных материалов, эпоксидных смол и др. Эти производства имеют важное значение для Республики Беларусь, поскольку на Новополоцком ПО «Полимир» планируется пуск линии по получению окиси этилена. Помимо этого, другой, не менее известной областью применения эпоксидных соединений, является их использование в получении жидкокристаллических материалов, а также в производстве печатных красок, в получении технологических композиций с улучшенными влаго- и термостойкостью. Наряду с этим, использование эпоксидов в качестве реакционноспособных энантиомерно обогащенных форм интермедиатов дает возможность получать такие биологически активные вещества, как лейкотриены, эритромицин, γ -амино- β -гидроксимасляную кислоту. Кроме того, некоторые оптически активные эпоксиды являются конечными продуктами реакций получения биологически активных веществ. Среди них – инсектицидный феромон «Вомбух», использующийся для борьбы с вредителями растений. Синтетические спирооксираны стероидного ряда обладают антиандрогенным и анаболическим действием, могут использоваться в качестве антидепрессантов, антиаритмических, гипотензивных и противовирусных препаратов. Синтез и исследование свойств этих соединений проводятся белорусскими учеными в НАН Беларуси, БГУ и МГМИ.

Использование методов химического синтеза оптически активных эпоксидных соединений ограничивается тем, что некоторые этапы сложных органических синтезов либо невозможны, либо сопровождаются образованием рацемической смеси стереоизомеров и побочных продуктов. Увеличение химических и оптических выходов эпоксидов и в будущем останется основной проблемой в асимметрическом органическом синтезе.

Эти проблемы могут быть сняты применением биокатализа ввиду высокой стереоспецифичности многих ферментативных реакций.



Биокатализ также выгодно отличает то, что он протекает при низких температурах и давлении. Использование живых клеток микроорганизмов в этих процессах является предпочтительным, поскольку не требуется выделения в чистом виде лабильных белковых молекул ферментов. В отличие от изолированных ферментов, применение клеток микроорганизмов позволяет регулировать активность тех или иных ферментных систем путем изменения состава среды культивирования и условий биотрансформации.

Существует несколько методов микробиологического синтеза оптически активных эпоксидов. При этом основное внимание исследователей сосредотачивалось на изучении возможности использования ферментных систем микроорганизмов для синтеза хиральных эпоксидов с оксирановым циклом в конце углеводородной цепи. До настоящего времени среди существующих методов остается нереализованной возможность синтеза хиральных эпоксидов с оксирановым циклом, удаленным от конца углеводородной цепи, путем микробиологического окисления стерически затрудненной двойной связи соответствующих алкенов. В связи с этим возникла необходимость в проведении исследований по изучению возможности синтеза хирального эпоксида с оксирановым циклом, удаленным от конца углеводородной цепи, не описанного в литературе, путем микробиологического окисления соответствующего алкена, а также с помощью химико-ферментативного синтеза из соответствующих α -галогенкетонов с целью выбора оптимального метода синтеза данного соединения и определения его стереохимии.

Связь работы с крупными научными программами, темами. Диссертационная работа выполнена на кафедре биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета в течение 1994-2001 гг. в рамках научно-исследовательской темы «Исследовать биохимические основы и разработать технологические аспекты использования иммобилизованных систем в биокатализе углеводов и биоконверсии органических веществ», № Гос. регистрации 1994756 (1994-1996 гг.) и межвузовской программы «Ксенобиотики и живые системы» – «Исследование механизмов биотрансформации ксенобиотиков иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами с целью защиты окружающей среды и биосинтеза ценных химических соединений», № гос. регистрации 1996557 (1996-2000 гг.), а также в рамках проекта Французского национального центра научных исследований (1994-1995 гг.).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в микробиологическом получении хирального 4,5-эпоксинонана 2-мя путями – микробиологическим окислением соответствующего алкена и химико-ферментативным синтезом из α -галогенкетонов.

Из поставленной цели вытекает необходимость решения следующих задач:

1. Провести отбор штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, способных эпоксидировать алкены с двойной связью в конце углеводородной цепи.

2. Исследовать процесс эпоксидирования алкена с двойной связью, удаленной от конца углеводородной цепи, клетками бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Pseudomonas fluorescens* B-22.

3. Изучить свойства монооксигеназной ферментной системы бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22.

4. Провести синтез хиральных α -хлоргидринов из соответствующих α -хлоркетонов с использованием различных штаммов мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий.

5. Провести химический синтез хирального 4,5-эпоксинонана из хиральных α -хлоргидринов и изучить их стереохимию.

Объект и предмет исследования. Объектами исследований служили углеводородокисляющие бактерии рода *Pseudomonas*, а также микроорганизмы, восстанавливающие карбонильные соединения и способные образовывать α -галогенгидрины из α -галогенкетонов. Предмет исследования – получение хиральных эпоксидов с применением ферментных систем микроорганизмов, установление роли монооксигеназной ферментной системы в эпоксидировании алкенов и анализ стереохимии α -хлоргидринов и 4,5-эпоксинонана.

Методология и методы проведенного исследования. В работе использовали современные микробиологические, биохимические, химические и физико-химические методы исследования: химические методы синтеза α -хлоркетонов, α -хлоргидринов и эпоксидов; метод жидкостной колоночной хроматографии для выделения diaзокетонов, α -хлоркетонов, диастереомеров α -хлоргидринов, эпоксидов и спиртов; ГЖХ-методы контроля содержания алкенов, α -хлоркетонов, α -хлоргидринов и эпоксидов в культуральных жидкостях и определения энантиомерных избытков диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов; метод ТСХ для идентификации α -хлоркетонов и α -хлоргидринов; методы электронной

спектрофотометрии для определения активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b_5 и P-450 в клетках бактерий, количественного определения белка; методы спектроскопии ЯМР для определения абсолютной конфигурации диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов и их энантиомерных избытков; поляриметрический метод определения удельного вращения энантиомеров спиртов и диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов.

Научная новизна и значимость полученных результатов. В настоящей работе впервые осуществлен синтез оптически активного 4,5-эпоксинонана из нонена-4 с использованием ферментных систем бактерий, а также из 4-хлор-5-нонанона и 5-хлор-4-нонанона с использованием мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий на стадии восстановления α -хлоркетонов в α -хлоргидрины.

Впервые установлено, что только цис-изомер нонена-4 подвергается эпоксидированию бактериями *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*.

Впервые показаны наличие цитохром P-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы и активация ее биосинтеза в клетках бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*, эпоксидирующих алкены.

Показана зависимость активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b_5 и P-450 у бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22* от структуры субстрата и фазы роста бактерий.

Впервые определены абсолютные конфигурации диастереомеров 5-хлор-4-нонанола, 4-хлор-5-нонанола и 4,5-эпоксинонана с применением химических и физико-химических методов анализа.

Практическая (экономическая, социальная) значимость полученных результатов. Разработан способ получения оптически активного 4,5-эпоксинонана с применением ферментных систем микроорганизмов.

Модифицирован стандартный метод определения содержания цитохромов b_5 и P-450 в клетках бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*.

Социальный эффект и практическая значимость выполненной работы состоят в том, что изученные микроорганизмы могут быть использованы в составе консорциумов для защиты окружающей среды от загрязнения ее алкенами и α -галогенкетонами.

Результаты исследований могут быть использованы при разработке технологии микробиологического получения оптически активных эпоксидных соединений, необходимых для производства жид-

кокристаллических материалов, применяемых на Минском ПО «Интеграл».

Комплекс методов, использованных при определении абсолютной конфигурации диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов, может быть применен для установления абсолютной конфигурации и других оптически активных соединений.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Pseudomonas fluorescens* B-22 эпоксируют гексен-1 и нонен-4, причем более эффективно – бактерии *P. fluorescens* B-22. Максимальная степень конверсии гексена-1 и нонена-4 для *P. aeruginosa* PAO1 составляет 61,5% и 9,9% соответственно, а для *P. fluorescens* B-22 – 70,6% и 14,2% соответственно. Только цис-изомер нонена-4 подвергается эпоксидированию данными бактериями.

Бактерии *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22, эпоксирующие алкены, содержат цитохром P-450-зависимую монооксигеназную ферментную систему. Активности различных оксидоредуктаз и содержание цитохромов b_5 и P-450 у данных бактерий зависят от структуры субстрата и фазы роста бактерий.

С использованием различных штаммов мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий получены 3 оптически активных диастереомера 5-хлор-4-нонанола и 4-хлор-5-нонанола.

В результате химического синтеза из диастереомеров 5-хлор-4-нонанола и 4-хлор-5-нонанола получены четыре энантиомерно чистых изомера 4,5-эпоксинонана с высокими выходами.

Определены энантиомерные избытки и абсолютная конфигурация диастереомеров 5-хлор-4-нонанола, 4-хлор-5-нонанола и 4,5-эпоксинонана.

Химико-ферментативный синтез хирального 4,5-эпоксинонана из α -хлоркетонов является предпочтительным по сравнению с микробиологическим окислением нонена-4.

Личный вклад соискателя. Диссертант принимала непосредственное участие в получении экспериментальных данных, составляющих основу диссертации, их анализе, обобщении и изложении материала настоящей работы. Соавторами публикаций соискателя являются сотрудники кафедры биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета, а также лаборатории химии и электрохимии биологических систем университета им. Б. Паскаля г. Клермон-Феррана (Франция).

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертационной работы докладывались на: Международной конференции «Проблемы микробиологии и биотехнологии» (г. Минск, 1998 г.); Международной конференции «Разработка импортозамещающих технологий и материалов в химической промышленности» (г. Минск, 1999 г.); Международной конференции «Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия» (г. Минск, 2000 г.); Международной конференции «Новые технологии рециклинга вторичных ресурсов» (г. Минск, 2001 г.), а также ежегодных научно-технических конференциях сотрудников БГТУ (г. Минск, 1996-2001 гг.). Диссертационная работа доложена на расширенном совместном заседании кафедр биотехнологии и биоэкологии и органической химии Белорусского государственного технологического университета, г. Минск, 2001 г.

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 9 статей и 4 материалов различных конференций. Общее количество страниц опубликованных материалов – 65.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания объектов и методов исследований и экспериментальной части (2 главы), заключения, списка использованных источников, приложений. Работа изложена на 137 страницах, содержит 12 таблиц, 25 рисунков, 3 приложения и 248 литературных источников.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1 диссертационной работы является обзором литературы и состоит из трех разделов, в которых приводятся сведения о способах микробиологического получения хиральных эпоксидов; рассматриваются механизмы действия ферментных систем, участвующих в этих процессах.

В главе 2 дается общая характеристика объектов и методов исследования.

Объектами исследований служили:

- алкены – гексен-1 и нонен-4;
- α -хлоркетоны – 5-хлор-4-нонанол и 4-хлор-5-нонанон;
- углеводородокисляющие бактерии *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Pseudomonas fluorescens* B-22, полученные из ВКМ РАН;
- микроорганизмы, восстанавливающие карбонильные соединения: мицелиальные грибы – *Aspergillus niger* ATCC (American Type Culture Collection) 9142, *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Cunning-*

hamella echinulata var. *elegans* ATCC 9245, *Geotrichum candidum* CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures) 233-76, *Mortierella isabellina* NRRL (Northern Regional Research Laboratories) 1757; дрожжи – *Saccharomyces cerevisiae* (коммерческий продукт VAHINE Montoux), *Rhodotorula glutinis* NRRL Y 1091 и бактерии *Lactobacillus kefir* DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) 20587.

Для культивирования микроорганизмов использовали полноценные, полусинтетические и синтетические среды. Глюкозу, гексан, гексен-1, нонан, нонен-4, 5-хлор-4-нонанон и 4-хлор-5-нонанон добавляли в качестве единственного источника углерода и энергии в количестве 0,1 и 0,2 % (об.).

Культивирование микроорганизмов осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 и 500 мл на качалке в условиях аэрации (200 об/мин) при 27° и 30°C.

Рост бактериальных культур контролировали путем измерения экстинкции культуральной жидкости на фотометре КФК-3 в кюветах толщиной 0,5 см при 580 нм.

Химический синтез окисей гексена-1 и нонена-4 проводили по методу [Anderson H.V., Garrett E.R., Lincoln F.H. e.a., 1954], 5-хлор-4-нонанона – по методу [Fawzi M.M., Gutsche C.D., 1966; Hooz J., Bridson J.N., 1972], 4-хлор-5-нонанона – по методу [Bodot H., Dieuzeide E., Jullien J., 1960], 4,5-эпоксинонана – по методу [Denmark S.E., Parker J.D.L., Dixon J.A., 1997], (+)- α -метокси- α -трифторметилацетилхлорида – по методу [Dale J.A., Dull D.L., Mosher H.S., 1969], дехлорирование 5-хлор-4-нонанола – по методу [Denmark S.E., Parker J.D.L., Dixon J.A., 1997], раскрытие 4,5-эпоксинонана – по методу [Eliel E.L., Rerick M.N., 1960].

Выделение диазокетонов, α -хлоркетонов, диастереомеров α -хлоргидринов, эпоксидов и спиртов осуществляли методом жидкостной колоночной хроматографии на колонках 1x100 см или 3x200 см с силикагелем 60 Merck (70-230 mesh) в системе пентан:диэтиловый эфир (95:5, об.).

Идентификацию α -хлоркетонов и α -хлоргидринов проводили методом ТСХ с использованием пластинок силикагеля 60 F₂₅₄, пятна с пластинок элюировали смесью пентан:диэтиловый эфир (95:5, об.). Проявление хроматограмм осуществляли путем распыления раствора ванилина.

Определение содержания алкенов и окисей алкенов в культуральных жидкостях проводили методом ГЖХ на хроматографе Hewlett Packard HP 4890D, содержания α -хлоркетонов, α -

хлоргидринов и эпоксидов, а также энантиомерных избытков диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов - на хроматографе Delsi-Nermag.

Определение активностей оксидоредуктаз в клетках бактерий осуществляли по методу [Dallner G., 1963; Roering D.L. e.a., 1972], а содержания цитохромов b_5 и P-450 - в соответствии с модифицированным нами методом [Omura T., Sato R., 1964] на спектрофотометре Specord M-40.

Для определения абсолютной конфигурации диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов и их энантиомерных избытков использовали методы спектроскопии ЯМР ^{13}C и ^1H (Bruker AC400).

Определение удельного вращения энантиомеров спиртов, диастереомеров α -хлоргидринов и эпоксидов проводили на поляриметре Perkin-Elmer 141 (полоса J ртутная).

В главе 3 представлены результаты исследований процессов получения хиральных эпоксидов микробиологическим окислением алкенов с двойной связью в конце и удаленной от конца углеводородной цепи, изучения свойств монооксигеназной ферментной системы бактерий *Pseudomonas aeruginosa PAO1* и *Pseudomonas fluorescens B-22*, получения хирального 4,5-эпоксинонана из соответствующих α -хлоркетонов и определения его абсолютной конфигурации.

Непременным условием для регулирования процесса трансформации субстрата в продукт являются знания корреляции между ростовым и трансформационным процессами, происходящими в культуре микробных клеток. Исследования динамики окисления гексена-1 растущими на среде с гексаном в качестве единственного источника углерода и энергии культурами бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22* показали, что максимальной продуктивности по 1,2-эпоксигексану клетки бактерий обоих видов достигают в середине логарифмической фазы роста. Причем, бактерии *P.fluorescens B-22* более эффективно эпоксируют гексен-1, чем бактерии *P.aeruginosa PAO1*. Максимальная степень конверсии гексена-1 для первых составляет 70,6% , а для вторых - 61,5%.

По мере удаления двойной связи от конца к середине углеводородной цепи алкена эффективность микробиологического эпоксидирования снижается, что обусловлено стерическими затруднениями. Динамика окисления нонена-4 растущими на среде с нонаном в качестве единственного источника углерода и энергии культурами бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22* аналогична таковой при окислении гексена-1 за исключением того, что кинетика клеточного

роста характеризуется наличием более длительной лаг-фазы, необходимой микроорганизмам для адаптации к субстрату с большим числом углеродных атомов. Как и в случае окисления гексена-1, более эффективно эпоксируют нонен-4 бактерии *P. fluorescens* B-22. Максимальная степень конверсии нонена-4 для них составляет 14,2%, а для *P. aeruginosa* PAO1 - 9,9%.

Результаты исследования специфичности эпоксирирования нонена-4 бактериями *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22 в зависимости от конфигурации двойной связи свидетельствуют о том, что эпоксирированию подвергается только цис-изомер нонена-4.

Функционирование цитохром Р-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы требует участия оксидоредуктаз НАДФН·Н⁺- и НАДН·Н⁺-зависимых электронтранспортных цепей, цитохромов b₅ и Р-450. Результаты исследований влияния структуры окисляемого субстрата на активность оксидоредуктаз и содержание цитохромов b₅ и Р-450 в клетках бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22 показали, что при замене шестиуглеродного углеводного субстрата на шестиуглеродные углеводородные для обоих штаммов бактерий происходит увеличение всех видов НАДН·Н⁺-редуктазных активностей, в то время как НАДФН·Н⁺-редуктазные активности или незначительно увеличиваются в большинстве случаев, или даже уменьшаются (табл.1). Однако, такой тенденции не наблюдается при использовании девятиуглеродного углеводорода – нонена-4. Разнонаправленные изменения активностей различных оксидоредуктаз объясняются различием химических реакций, протекающих на цитохроме Р-450 с разными углеводородами.

Максимальные значения НАДН·Н⁺- и НАДФН·Н⁺-феррицианидредуктазных активностей свидетельствуют о том, что наибольшее влияние углеводородные субстраты оказывают на активность НАДН·Н⁺-цитохром b₅-редуктаз и НАДФН·Н⁺-цитохром Р-450-редуктаз, участвующих в транспорте электронов от НАДН·Н⁺ и НАДФН·Н⁺ соответственно к цитохромам b₅ и Р-450. Это, в свою очередь, указывает на непосредственное участие цитохромов b₅ и Р-450 в окислении углеводородных субстратов клетками бактерий.

В результате измерения содержания цитохромов b₅ и Р-450 в клетках *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22 показано, что в клетках бактерий обоих видов, взятых в различных фазах роста, замена глюкозы на углеводороды вызывает активацию биосинтеза цитохромов b₅ и Р-450 (табл.2). Значительное увеличение содержания ферментов в клетках бактерий наблюдается в экспоненциальной и ста-

ционарной фазе роста (для *P.aeruginosa PAO1*). Причем, это увеличение наиболее заметно для бактерий *P.fluorescens B-22*, что хорошо согласуется с данными по наибольшей эффективности эпоксидирования гексена-1 и нонена-4 этими бактериями. При переходе клеток из экспоненциальной фазы в стационарную содержание гемопротеинов уменьшается в связи с исчерпанием источника углерода в среде.

Таблица 1

Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*, выращенных на различных субстратах

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин·мг белка			
	субстрат			
	глюкоза	гексан	гексен-1	нонен-4
<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>				
НАДН:2,6-ДХФИФ ¹	1,71	2,30	2,70	3,51
НАДФН:2,6-ДХФИФ	2,21	2,94	3,07	1,68
НАДН:цитохром с	1,81	1,98	3,15	0,97
НАДФН:цитохром с	0,52	0,39	1,43	0,40
НАДН:K ₃ Fe(CN) ₆	21,47	79,90	83,24	35,48
НАДФН: K ₃ Fe(CN) ₆	14,24	43,07	26,22	20,54
НАДН:НТ ²	0,35	0,35	0,06	0,11
НАДФН:НТ	0,14	0,27	0,21	0,03
<i>Pseudomonas fluorescens B-22</i>				
НАДН:2,6-ДХФИФ	4,11	4,94	7,44	3,77
НАДФН:2,6-ДХФИФ	1,65	1,67	2,83	2,09
НАДН:цитохром с	1,66	2,78	4,17	0,37
НАДФН:цитохром с	0,51	0,86	0,84	0,43
НАДН: K ₃ Fe(CN) ₆	50,26	60,46	82,48	28,57
НАДФН: K ₃ Fe(CN) ₆	27,78	31,30	56,10	13,76
НАДН:НТ	0,10	0,17	0,14	0,14
НАДФН:НТ	0,23	0,21	0,12	0,07

Примечания:

1. 2,6-ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия;
2. НТ – неотетразолий синий.

Таблица 2

Содержание цитохромов b_5 и P-450 в клетках *P.aeruginosa* PAO1 и *P.fluorescens* B-22, выращенных на различных субстратах и в зависимости от фазы роста бактерий

Субстрат	Содержание цитохрома b_5 , нмоль/мг белка		Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	
	экспонен- циальная фаза	стацио- нарная фаза	экспонен- циальная фаза	стацио- нарная фаза
	Pseudomonas		aeruginosa PAO1	
Глюкоза	0,01	0,01	0,03	0,02
Гексан	0,02	0,02	0,05	-
Гексен-1	0,04	0,04	0,08	0,04
Нонен-4	0,06	0,03	0,09	0,08
	Pseudomonas		fluorescens B-22	
Глюкоза	0,04	0,02	0,02	-
Гексан	0,12	0,05	0,10	0,08
Гексен-1	0,18	0,03	0,21	0,03
Нонен-4	0,05	0,01	0,18	0,02

В исследованиях процесса микробиологического восстановления α -хлоркетонов – 5-хлор-4-нонанона и 4-хлор-5-нонанона – использованы микроорганизмы: *Aspergillus niger*, *Mortierella isabellina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis* и *Lactobacillus kefir*.

Результаты микробиологического восстановления 5-хлор-4-нонанона и 4-хлор-5-нонанона (табл.3) свидетельствуют о том, что для обоих α -хлоргидринов получены 3 оптически активных диастереомера (трео-(4S,5S)-, эритро-(4S,5R)- и эритро-(4R,5S)-изомеры).

В связи с тем, что энантиомерная чистота эпоксидов непосредственно связана с энантиомерной чистотой соответствующих диастереомеров α -хлоргидринов, для химического синтеза эпоксидов из α -хлоргидринов выбраны диастереомеры α -хлоргидринов с наибольшими энантиомерными избытками. В результате получены четыре энантиомерно чистых изомера 4,5-эпоксинонана (табл.4). Выходы эпоксидов достаточно высокие, причем цис-(4S,5R)- и цис-(4R,5S)-изомеры 4,5-эпоксинонана образуются соответственно из трео-

(4S,5S)-изомеров 5-хлор-4-нонанола и 4-хлор-5-нонанола, транс-(4S,5S)-эпоксиднонана – из эритро-(4S,5R)-5-хлор-4-нонанола и эритро-(4R,5S)-4-хлор-5-нонанола, а транс-(4R,5R)-эпоксиднонана – из эритро-(4R,5S)-5-хлор-4-нонанола, т.е. в ходе образования эпоксида происходит инверсия конфигурации атома углерода α -хлоргидрина, несущего хлор. Рацемизации в ходе реакции дегидрогалогенирования не наблюдалось.

Таблица 3

Эффективность и стереоспецифичность микробиологического восстановления α -хлоркетонов

Микро-организмы	Суб-страт	Трео хлоргидрин			Эритро хлоргидрин			Выход, % (соотно-шение диастере-омеров)
		$[\alpha]_D^{25}$, град.	е.е., %	абс. конф.	$[\alpha]_D^{25}$, град.	е.е., %	абс. конф.	
S.cerevisiae	1*	-36	≥ 98	4S,5S	+14	≥ 98	4S,5R	15 (57/43)
	2*	-6	17	4S,5S	+13	≥ 98	4R,5S	28 (85/15)
R.glutinis	1	-36	≥ 98	4S,5S	-14	≥ 98	4R,5S	8 (50/50)
	2	-32	≥ 98	4S,5S	+10	78	4R,5S	14 (50/50)
A.niger	1	-23	65	4S,5S	-10	71	4R,5S	8 (60/40)
M.isabellina	1	-11	30	4S,5S	-	-	-	5 (85/15)
	2	-4	12	4S,5S	+3	23	4R,5S	52 (50/50)
L.kefir	1	-27	75	4S,5S	-14	≥ 98	4R,5S	6 (40/60)
	2	-32	≥ 98	4S,5S	-13	≥ 98	4S,5R	20 (40/60)

Примечания:

1. 1* – 5-хлор-4-нонанон;
2. 2* – 4-хлор-5-нонанон.

Для определения энантиомерных избытков (е.е.) каждого изомера α -хлоргидринов и 4,5-эпоксиднонана применяли ряд методов. Анализ е.е. диастереомеров 5-хлор-4-нонанола и 4,5-эпоксиднонана проводили с помощью ГЖХ с использованием колонки с хиральной неподвижной фазой. Анализ е.е. диастереомеров 4-хлор-5-нонанола осуществляли с помощью ПМР-спектроскопии с применением метода определения диастереомерного состава после превращения каждого диастереомера рацемической смеси α -хлоргидрина (для выбора

оптимальных условий выделения 2-х энантиомеров) и последующего превращения оптически активного энантиомера α -хлоргидрина в соответствующие α -метокси- α -трифторметилфенилацетаты (МТФА-эфиры).

Таблица 4

Сtereoхимические соотношения 4,5-эпоксиднонана
с предшественниками

α -Хлоркетон	α -Хлоргидрин		Эпоксид			Выход, %
	абс. конф.	биокатализатор	$[\alpha]_D^{25}$, град.	е.е., %	абс. конф.	
1*	(4S,5S)	<i>S.cerevisiae</i>	-5	≥ 98	(4S,5R)	50
1	(4S,5R)	<i>S.cerevisiae</i>	-32	≥ 98	(4S,5S)	70
1	(4R,5S)	<i>L.kefir</i>	+32	≥ 98	(4R,5R)	72
2*	(4S,5S)	<i>R.glutinis</i>	+5	≥ 98	(4R,5S)	48
2	(4R,5S)	<i>R.glutinis</i>	-25	≥ 98	(4S,5S)	71

Примечания:

1. 1* - 5-хлор-4-нонанон;
2. 2* - 4-хлор-5-нонанон.

Для определения абсолютной конфигурации диастереомеров 5-хлор-4-нонанола сначала проводили реакцию дехлорирования для α -хлоргидрина, который первым элюировался из колонки среди продуктов восстановления 5-хлор-4-нонанона дрожжами *S.cerevisiae*. Полученный 4-нонанол имел S-конфигурацию (исходя из сравнения знака удельного вращения полученного спирта с литературными данными). Таким образом, асимметрический атом С-4 5-хлор-4-нонанола имеет S-конфигурацию. Для определения абсолютной конфигурации С-5 атома 5-хлор-4-нонанола осуществляли превращение 5-хлор-4-нонанола в 4,5-эпоксиднонан, по ПМР-спектру которого была установлена его цис-конформация. Известно, что цис-эпоксиды образуются из трео- α -хлоргидринов, тогда как транс-эпоксиды - из эритро- α -хлоргидринов. Более того, при образовании эпоксида происходит инверсия конфигурации атома углерода, несущего хлор. В связи с этим, полученный нами изомер 5-хлор-4-нонанола имеет трео-(4S,5S)-конфигурацию, а цис-4,5-эпоксиднонан - (4S,5R)-конфигурацию.

Эти же реакции были проведены и для другого изомера 5-хлор-4-нонанола. В результате реакций получены (4S)-4-нонанола и транс-(4S,5S)-эпоксинонан, вследствие чего второму изомеру 5-хлор-4-нонанола присвоена конфигурация эритро-(4S,5R).

Абсолютные конфигурации диастереомеров 4-хлор-5-нонанола, полученного восстановлением 4-хлор-5-нонанола дрожжами *R. glutinis*, были определены с помощью синтеза соответствующих 4,5-эпоксинонанов. Изомер 4-хлор-5-нонанола, первым элюировавшийся из хроматографической колонки, был превращен в 4,5-эпоксинонан, по ПМР-спектру которого была установлена его цис-конформация. Знак его удельного вращения был противоположен знаку удельного вращения цис-(4S,5R)-эпоксинонана, полученного циклизацией трео-(4S,5S)-5-хлор-4-нонанола. В связи с этим, первому элюировавшемуся изомеру 4-хлор-5-нонанола была присвоена трео-(4S,5S)-конфигурация, а цис-4,5-эпоксинонану — (4R,5S)-конфигурация. С помощью той же реакции из второго элюировавшегося из хроматографической колонки изомера 4-хлор-5-нонанола был получен транс-(4S,5S)-эпоксинонан. Знак его удельного вращения соответствовал знаку удельного вращения транс-(4S,5S)-эпоксинонана, полученного циклизацией эритро-(4S,5R)-5-хлор-4-нонанола. Поэтому второму изомеру 4-хлор-5-нонанола была присвоена эритро-(4R,5S)-конфигурация.

Эти результаты были подтверждены и другим химическим превращением. Каждый диастереомер 4,5-эпоксинонана был подвергнут обработке с целью раскрытия оксиранового цикла с образованием смеси 4- и 5-нонанолов. В связи с тем, что 5-нонанола оптически неактивен, знак удельного вращения полученной смеси соответствовал знаку удельного вращения 4-нонанола. На основании сравнения знаков удельного вращения энантиомеров 4-нонанола с литературными данными мы присвоили (4R)-конфигурацию спирту, полученному из цис-(4R,5S)-эпоксинонана, и (4S)-конфигурацию спирту, полученному из транс-(4S,5S)-эпоксинонана. Так как реакция эпексидирования протекает с инверсией конфигурации С-4 атома, мы подтвердили присвоенную ранее конфигурацию С-4 атома обоих диастереомеров 4-хлор-5-нонанола.

Таким образом, проведенные исследования показали, что с точки зрения химических и оптических выходов для получения хиральных эпексидных соединений с оксирановым циклом, удаленным от конца углеводородной цепи, целесообразно использовать химико-ферментативный синтез из соответствующих α -

галогенкетонов. На рис.1 представлена схема получения оптически активного 4,5-эпоксинонана с использованием ферментных систем микроорганизмов.

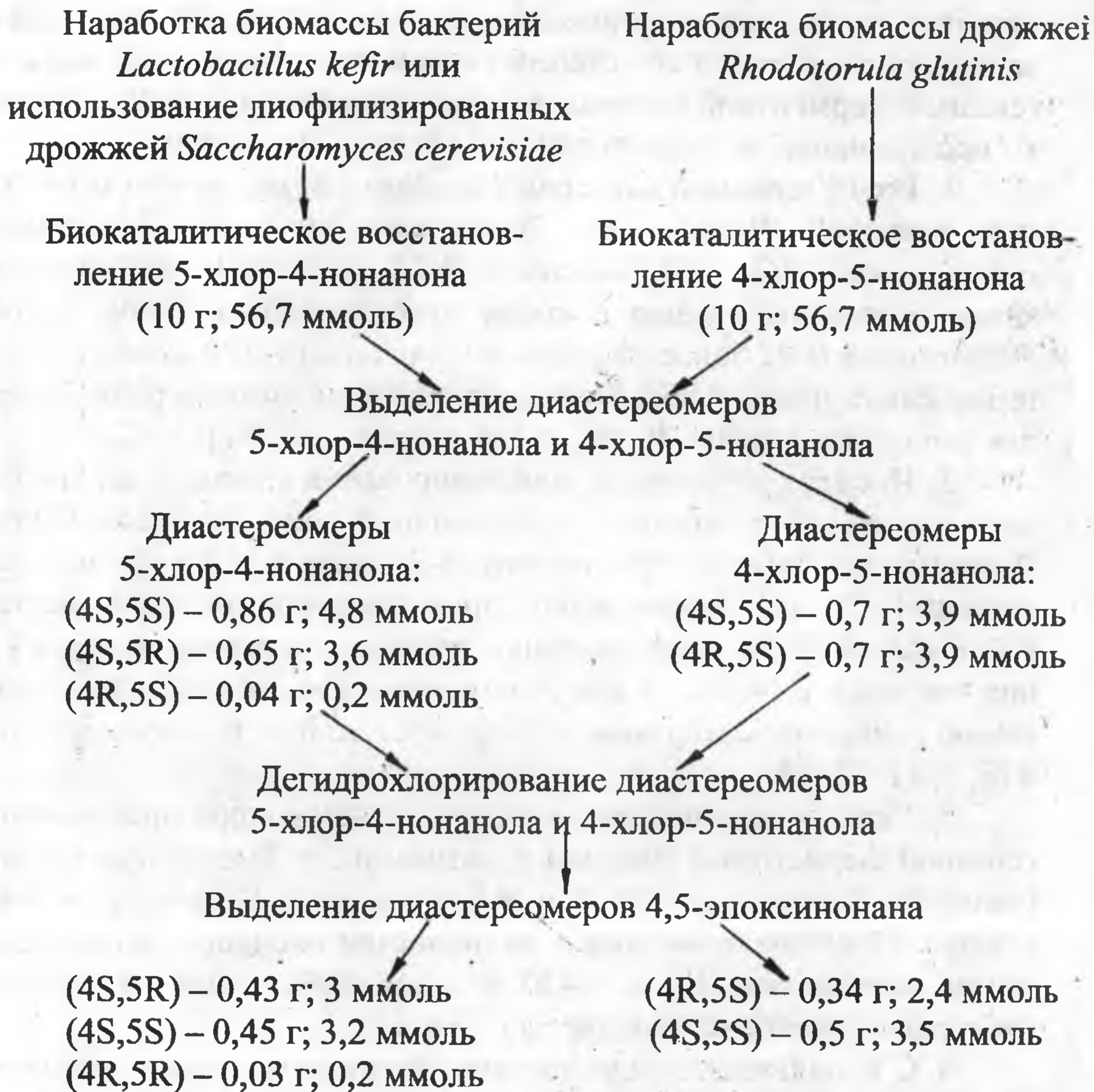


Рис.1. Способ получения оптически активного 4,5-эпоксинонана с использованием ферментных систем микроорганизмов

Применение разных микроорганизмов на стадии восстановления α -галогенкетонов в α -галогенгидрины может обеспечить целевое получение строго определенных энантиомеров соответствующих эпоксидных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований с использованием ферментных систем микроорганизмов получен оптически активный 4,5-эпоксинонан, изучена его стереохимия и определена роль монооксигеназной ферментной системы в эпоксидировании алкенов. Результаты исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Из 15 штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и 14 штаммов бактерий *Pseudomonas fluorescens* отобраны 2 штамма — *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*, способные эпоксидировать алкен с двойной связью в конце углеводородной цепи. Бактерии *P.fluorescens B-22* более эффективно эпоксидируют гексен-1, чем бактерии *P.aeruginosa PAO1*. Максимальная степень конверсии гексена-1 для первых составляет 70,6% , а для вторых - 61,5% [11, 12, 13].

2. Исследован процесс эпоксидирования алкена с двойной связью, удаленной от конца углеводородной цепи, клетками бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*. Как и в случае окисления гексена-1, более эффективно эпоксидируют нонен-4 бактерии *P.fluorescens B-22*. Максимальная степень конверсии нонена-4 для них составляет 14,2% , а для *P.aeruginosa PAO1*- 9,9%. Эпоксидированию данными бактериями подвергается только цис-изомер нонена-4 [8, 9, 11, 12, 13].

3. Установлено наличие цитохром Р-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы и активация ее биосинтеза в клетках бактерий *P.aeruginosa PAO1* и *P.fluorescens B-22*, эпоксидирующих алкены. Показана зависимость активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b_5 и Р-450 у данных бактерий от структуры субстрата и фазы роста бактерий [7, 10, 13].

4. С использованием различных штаммов мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий получены 3 оптически активных диастереомера 5-хлор-4-нонанола и 4-хлор-5-нонанола (трео-(4S,5S)-, эритро-(4S,5R)- и эритро-(4R,5S)-изомеры) [2, 4, 6, 8, 12, 13].

5. Из диастереомеров 5-хлор-4-нонанола и 4-хлор-5-нонанола получены четыре изомера 4,5-эпоксинонана (цис-(4S,5R)-, цис-(4R,5S)-, транс-(4S,5S)- и транс-(4R,5R)-изомеры) с высокими химическими (48-72%) и оптическими (e.e. $\geq 98\%$) выходами, что делает химико-ферментативный синтез хирального 4,5-эпоксинонана из α -хлоркетонов предпочтительным по сравнению с микробиологическим эпоксидированием нонена-4 [6, 8, 12, 13].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Сокольчик Т.И., Усова Е.В., Леонтьев В.Н. Скрининг и характеристика углеводородокисляющих микроорганизмов // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и технология органических веществ. – 1994. – Вып. 2. – С. 84-88.
2. Сокольчик Т.И. Микроорганизмы в получении эпоксидных соединений // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и химическая технология. – 1996. – Вып. 3. – С. 66-69.
3. Сокольчик Т.И., Усова Е.В., Леонтьев В.Н. Разработка метода определения эпоксидных групп // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и химическая технология. – 1996. – Вып. 4. – С. 31-35.
4. Сокольчик Т.И., Весшамбрэ Г., Бэсс П., Леонтьев В.Н. Диастереоспецифический микробиологический синтез α -хлоргидринов // Вестник БГУ. Сер.2, Химия, биология, география. – 1998. – № 1. – С. 19-22.
5. Леонтьев В.Н., Сокольчик Т.И., Наскевич Н.Л. Микробиологическое восстановление несимметрических алифатических кетонов // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и химическая технология. – 1998. – Вып. 6. – С. 73-79.
6. Besse P., Sokoltchik T., Veschambre H. Chemoenzymatic synthesis of α -halogeno-3-octanol and 4-or 5-nonanols. Application to the preparation of chiral epoxydes // Tetrahedron: Asymmetry. – 1998. – Vol. 9. – P. 4441-4457.
7. Сокольчик Т.И., Леонтьев В.Н., Гриц Н.В. Зависимость активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b_5 и P-450 у бактерий рода *Pseudomonas* от структуры шестиуглеродного субстрата // Микробиол. – 1999. – Т. 68, № 3. – С. 299-303.
8. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Микробиологический синтез 4,5-эпоксинонана // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и технология органических веществ. – 2000. – Вып. 8. – С. 219-222.
9. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Эпоксидирование нонана-4 бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas fluores-*

cens // Труды Белорусского государственного технологического университета. Химия и технология органических веществ. – 2001. – Вып. 9. – С. 46-48.

Материалы конференций:

10. Сокольчик Т.И., Селицкая Л.А., Леонтьев В.Н. Исследование функционирования электронтранспортных цепей у бактерий рода *Pseudomonas* // Проблемы микробиологии и биотехнологии: Материалы междунар. конф., Минск, 25-27 нояб. 1998 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Концерн «Белбиофарм». Отд. биол. наук НАН Беларуси. Белорус. микробиол. об-во. Ин-т микробиол. – Минск, 1998. – С. 87-89.
11. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Эпоксидирование олефинов бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas fluorescens* // Разработка импортозамещающих технологий и материалов в химической промышленности: Материалы междунар. научно-техн. конф., Минск, 20-22 окт. 1999 г. / Мин-во образ. РБ, Белор. госуд. технол. ун-т. – Минск, 1999. – С. 221-223.
12. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Использование микроорганизмов в синтезе хиральных эпоксидов // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия: Материалы междунар. конф., Минск, 1-2 июня 2000 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Отд. биол. наук НАН Беларуси. Науч. совет по пробл. биотехнол. Белорус. микробиол. об-во. Ин-т микробиол. Концерн «Белбиофарм». Белорус. гос. ун-т. – Минск, 2000. – С. 146-147.
13. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Применение биотрансформаций для обезвреживания ксенобиотиков // Новые технологии рециклинга вторичных ресурсов: Материалы междунар. конф., Минск, 24-26 окт 2001 г. / Мин-во образ. РБ, Белор. госуд. технол. ун-т. – Минск, 2001. – С. 31-33.

РЕЗЮМЕ

АХРАМОВИЧ Татьяна Игоревна

Получение оптически активных эпоксидных соединений с применением ферментных систем микроорганизмов

Ключевые слова: микроорганизмы, оптически активные эпокси-ды, алкены, α -хлоркетоны, α -хлоргидрины, цитохромы b_5 и P-450, оксидоредуктазы, диастереомеры, абсолютная конфигурация.

Объекты исследования – углеводородокисляющие бактерии рода *Pseudomonas*, а также микроорганизмы, восстанавливающие карбонильные соединения и способные образовывать α -галогенгидрины из α -галогенкетонов. Цель работы – микробиологическое получение хирального 4,5-эпоксинонана 2-мя путями – микробиологическим окислением нонена-4 и химико-ферментативным синтезом из α -галогенкетонов. В работе использованы современные микробиологические, биохимические, химические и физико-химические методы исследования, оборудование отечественных и зарубежных фирм: УВМТ-12-250, КФК-3, Specord M-40, Hewlett Packard HP 4890D, Bruker AC 400, Perkin-Elmer 141. Впервые осуществлен синтез оптически активного 4,5-эпоксинонана из нонена-4 с использованием бактерий, а также из 5-хлор-4-нонанона и 4-хлор-5-нонанона с использованием мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий на стадии восстановления α -хлоркетонов в α -хлоргидрины. Впервые установлено, что только цис-изомер нонена-4 подвергается эпоксидированию вышеуказанными бактериями. Впервые показано наличие цитохром P-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы и активация ее биосинтеза в клетках бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Pseudomonas fluorescens* B-22, эпоксидирующих алкены. Впервые определена абсолютная конфигурация 5-хлор-4-нонанола, 4-хлор-5-нонанола и 4,5-эпоксинонана. Результаты исследований могут быть использованы при разработке технологии получения оптически активных эпоксидных соединений с оксирановым циклом, удаленным от конца углеводородной цепи, с помощью микроорганизмов, а также для защиты окружающей среды от загрязнения ее алкенами и α -галогенкетонами.

РЭЗЮМЭ

АХРАМОВІЧ Таццяна Ігараўна

Атрыманне аптычна актыўных эпаксідных злучэнняў з прымяненнем ферментных сістэм мікраарганізмаў

Ключавыя словы: мікраарганізмы, аптычна актыўныя эпаксіды, алкены, α -хлоркетоны, α -хлоргідрыны, цытахромы b_5 і P-450, аксідарэдуктазы, дыястэрэамеры, абсалютная канфігурацыя.

Аб'екты даследавання – бактэрыі роду *Pseudomonas*, якія акісляюць вуглевадароды, а таксама мікраарганізмы, якія аднаўляюць карбанільныя злучэнні і здольныя ўтвараць α -галагенгідрыны з α -галагенкетонаў. Мэта работы – мікрабіялагічнае атрыманне хіральнага 4,5-эпаксінанану 2-мя шляхамі – мікрабіялагічным акісленнем нанену-4 і хіміка-ферментатыўным сінтэзам з α -галагенкетонаў. У рабоце выкарыстаны сучасныя мікрабіялагічныя, біяхімічныя, хімічныя і фізіка-хімічныя метады даследавання, абсталяванне айчынных і замежных фірм: УВМТ-12-250, КФК-3, Specord M-40, Hewlett Packard HP 4890D, Bruker AC 400, Perkin-Elmer 141. Упершыню ажыццёўлены сінтэз аптычна актыўнага 4,5-эпаксінанану з нанену-4 з выкарыстаннем бактэрыі, а таксама з 5-хлор-4-нананону і 4-хлор-5-нананону з выкарыстаннем міцэліяльных грыбоў, дражджэй і бактэрыі на стадыі аднаўлення α -хлоркетонаў у α -хлоргідрыны. Упершыню ўстаноўлена, што толькі цыс-ізамер нанену-4 падвяргаецца эпаксідаванню вышэйпаказанымі бактэрыямі. Упершыню паказана наяўнасць цытахром P-450-утрымліваючай манааксігеназнай ферментнай сістэмы і актывацыя яе біясінтэзу ў клетках бактэрыі *Pseudomonas aeruginosa PAO1* і *Pseudomonas fluorescens B-22*, якія эпаксідуюць алкены. Упершыню вызначана абсалютная канфігурацыя 5-хлор-4-нананолу, 4-хлор-5-нананолу і 4,5-эпаксінанану. Рэзультаты даследаванняў могуць быць выкарыстаны пры распрацоўке тэхналогіі атрымання аптычна актыўных эпаксідных злучэнняў з аксіранавым цыклам, аддаленым ад канца вуглевадароднага ланцуга, з дапамогай мікраарганізмаў, а таксама для аховы навакольнага асяроддзя ад забруджвання яе алкенамі і α -галагенкетонамі.

AKHRAMOVICH Tatyana Igorevna

Preparation of optically active epoxide compounds using enzyme systems of microorganisms

Key words: microorganisms, optically active epoxides, alkenes, α -chloroketones, α -chlorohydrines, cytochromes b₅ and P-450, oxydoreductases, diastereomers, absolute configuration.

Objects of the investigation: bacteria of genus *Pseudomonas* oxydizing of hydrocarbons and microorganisms which capable to reduce of carbonylic compounds and transform α -chloroketones into α -chlorohydrines. Purpose of the investigation: preparation of chiral 4,5-epoxynonane by two methods using microorganisms - microbiological oxydation of nonene-4 and chemical-enzymatic synthesis from α -halogenoketones. Recent microbiological, biochemical, chemical and physico-chemical methods were applied and the following instruments were used: UVMT-12-250, KFK-3, Specord M-40, Hewlett Packard HP 4890D, Bruker AC 400, Perkin-Elmer 141. For the first time the optically active 4,5-epoxynonane has been synthesized from nonene-4 using bacteria, and also from 5-chloro-4-nonanone and 4-chloro-5-nonanone using fungi, yeasts and bacteria at the step of reduction of α -chloroketones into α -chlorohydrines, have been developed. For the first time it has been found that only cis-isomer of nonene-4 undergoes the epoxydation. For the first time the presence of cytochrome P-450-dependent monooxygenase enzyme system and activation of biosynthesis in alkene-epoxidizing *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pseudomonas fluorescens* B-22 cells has been shown. For the first time the absolute configuration of 5-chloro-4-nonanol, 4-chloro-5-nonanol and 4,5-epoxynonane has been established. The results of this investigation can be applied for designing microbiological technologies for preparation of optically active epoxides with non-terminal oxyrane ring and also for protection of environment from pollution by alkenes and α -haloketones.



A handwritten signature in black ink, appearing to be "А. А. А." or similar.

Ахрамович Татьяна Игоревна

**ПОЛУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ЭПОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Подписано в печать 21.02.2002. Формат 60x84 1/16. Печать офсетная.

Усл. печ.л. 1,5. Усл. кр.-отг. 1,5. Уч.-изд.л. 1,3.

Тираж 70 экз. Заказ № 78 .

Учреждение образования

«Белорусский государственный технологический университет».

Лицензия ЛВ № 276 от 15.04.98. 220050, Минск, Свердлова, 13а.

Отпечатано на ротапринтере учреждения образования

«Белорусский государственный технологический университет».

220050, Минск, Свердлова, 13.

279 63035



800000024 178 12