

ронкой, помещают раствор 5 г едкого натра в 100 мл воды. Охлаждают до 10 °С (лед). Затем добавляют раствор 2,5 г сернокислого магния в 20 мл воды. Вносят 130 г непредельного кетона и добавляют по каплям при 15-17 °С в течение 30 мин 150 г 28-30% перекиси водорода. Через 2-3 ч (по исчезновении резкого запаха непредельного кетона) раствор насыщают поваренной солью, экстрагируют эфиром, эфирные вытяжки сушат поташом (если сушат сульфатом натрия, то эфирный экстракт предварительно обрабатывают двуокисью марганца, иначе возможен взрыв!), отфильтровывают осушитель, отгоняют эфир и остаток перегоняют при пониженном давлении с елочным дефлегматором. Т.кип. 88-94 °С при 10 мм, $n_D^{20} = 1,4276$. Выход 5-метил-1,2-эпоксигексан-3-она V 42%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Звонок А.М. Синтез N-,O-гетероциклоалканонов внутримолекулярной циклизацией функционально замещенных эпоксикетонов/ Дис. на соиск. уч. степ. д.х.н. - 1990.
2. Органикум. Т.1 - М. : Мир, 1979.

УДК 573.6.086.83;663.1

В.Н. Леонтьев, доцент;
Т.И. Сокольчик, аспирант;
Н.Л. Наскевич, студентка

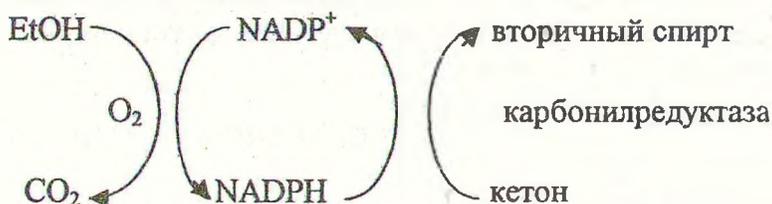
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕСИММЕТРИЧНЫХ АЛИФАТИЧЕСКИХ КЕТОНОВ

The reduction of methyl ethyl ketone and methyl isobutyl ketone by two baker's yeast strains under aerobic and anaerobic conditions was investigated. The different mediums in the presence and in the absence of co-substrate in them were used. The continuous process of methyl ethyl ketone reduction by immobilized on synthetic fibre yeast cells under anaerobic conditions was carried out.

Оптически активные соединения, в частности спирты, зачастую обладают биологической активностью. Исходными соединениями для их синтеза служат соединения с прохиральным атомом углерода - кетоны. Известно, что химические методы восстановления карбонильной группы, в особенности, если это полифункциональный кетон, либо затруднительны, либо не обеспечивают достаточной стереоселективности процесса [1]. Биологические методы более стереоселективны. Из литературы известно, что карбонильную группу способны восстанавливать ферментные системы дрожжей, бактерий и грибов [2,3,4]. При этом восстановление кетонов с высокой стереоселективностью осуществляют дрожжи *Saccharomyces*

cerevisiae [5]. В связи с этим целью нашей работы явилось исследование возможности восстановления несимметричных алифатических кетонов (метилэтилкетона и метилизобутилкетона) под действием ферментных систем пекарских дрожжей *S.cerevisiae*, причем в условиях длительного сохранения жизнеспособности клеток дрожжей для реализации непрерывного процесса микробиологического восстановления.

С точки зрения биохимии процесса микробиологического восстановления карбонильной группы, за основу была выбрана схема процесса восстановления кетона до вторичного спирта при участии фермента карбонилредуктазы, требующего присутствия восстановленного кофактора NADPH, а также косубстрата (этилового спирта), необходимого для регенерации восстановленного NADPH, окисляющегося до CO_2 в присутствии O_2 , предложенная японскими исследователями [6].



Нами был изучен процесс восстановления 2-х алифатических кетонов (метилэтилкетона и метилизобутилкетона) 2-мя штаммами пекарских дрожжей (*S.cerevisiae* Y1334 и коммерческого препарата пекарских дрожжей) в аэробных и анаэробных условиях, с использованием различных сред (дистиллированной воды, ацетатного буфера, модифицированной безазотной среды Ридер), в присутствии и в отсутствие косубстрата (этилового спирта) в среде.

Предварительно выращенные на плотной питательной среде клетки дрожжей культивировали на среде Ридер с глюкозой (2%) при 30°C в условиях аэрации (180 мин^{-1}) в течение 20 ч, биомассу отделяли центрифугированием (5000 мин^{-1}), тщательно отмывали от ростовой среды и ресуспендировали (концентрация биомассы 40 г/л) в соответствующей среде с кетоном (1%).

В ходе процесса восстановления кетона проводили микроскопические исследования дрожжевых клеток для оценки их физиологического состояния.

Пробы КЖ анализировали методом ГЖХ на хроматографе "Автохром" на колонке диаметром 3 мм и длиной 2 м, заполненной Карбоваксом 1500 на инертоне. Температура колонки 60°C . Газ-носитель - азот, детектор - ПИД.

На первой стадии исследования проводили в периодических условиях для выбора оптимальных параметров процесса (штаммы дрожжей, состав среды, аэробные или анаэробные условия, присутствие или отсутствие ко субстрата в среде).

В качестве примера на рис.1 представлены хроматограммы КЖ после 96 ч восстановления кетонов 2-мя штаммами дрожжей в аэробных и анаэробных условиях на дистиллированной воде.

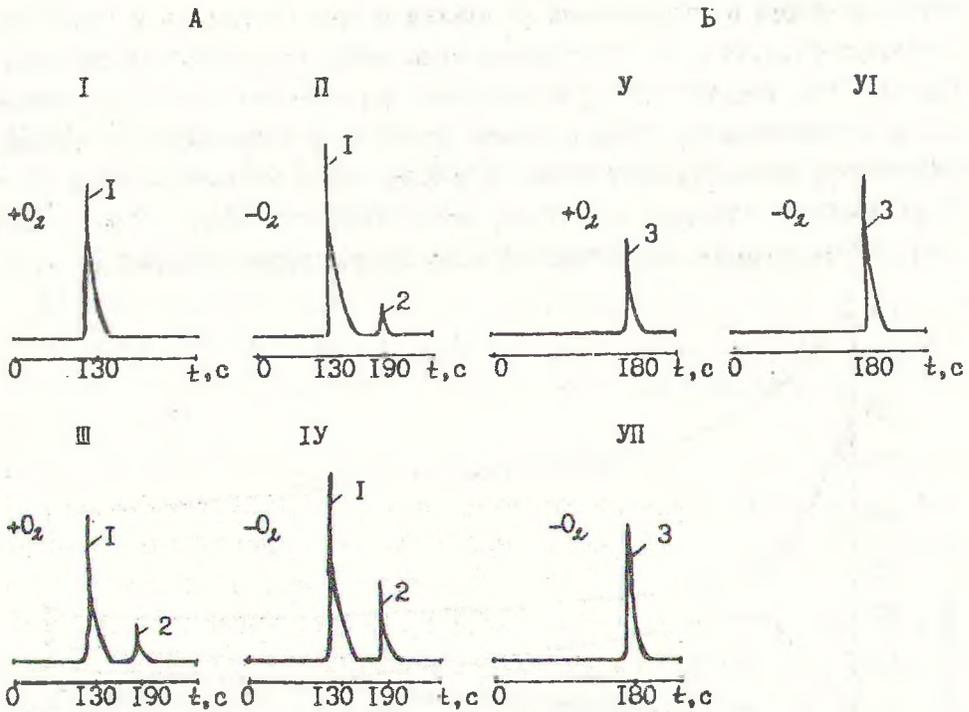


Рис.1. Хроматограммы культуральной жидкости после 96 ч восстановления метилэтилкетона (А) и метилизобутилкетона (Б) дрожжами *S.cerevisiae* Y1334 и коммерческим препаратом пекарских дрожжей в аэробных и анаэробных условиях: I,II,V,VI - *S.cerevisiae* Y1334; III,IV,VII - коммерческий препарат пекарских дрожжей; 1 - метилэтилкетон, 2 - вторичный бутиловый спирт, 3 - метилизобутилкетон.

Как видно из рис.1, аэрация ингибирует процесс восстановления метилэтилкетона (МЭК), причем наиболее выражено у дрожжей *S.cerevisiae* Y1334. При использовании коммерческого препарата дрожжей наблюдается образование незначительного количества вторичного бутилового спирта (ВБС) в аэробных условиях. Однако в анаэробных условиях выход спирта более высокий по абсолютной величине за счет того, что кетон в меньшей

степени утилизируется клетками в качестве источника углерода, чем в аэробных условиях.

В случае использования метилизобутилкетона (МИБК) образования вторичного спирта не происходит ни в аэробных, ни в анаэробных условиях ни одним из 2-х использованных штаммов, причем скорость утилизации МИБК выше, чем МЭКа.

Исследования кинетики восстановления МЭКа коммерческим препаратом дрожжей в анаэробных условиях в присутствии и в отсутствие ко-субстрата показали, что ко-субстрат незначительно влияет на выход спирта. Однако его присутствие увеличивает начальную скорость утилизации МЭКа и образования ВБС, причем до 30-го ч ферментации наблюдается увеличение концентрации этанола в КЖ, которое мы склонны объяснять сбраживанием сахара, вероятно, используемого фирмой-изготовителем при гранулировании коммерческого препарата дрожжей (рис.2).

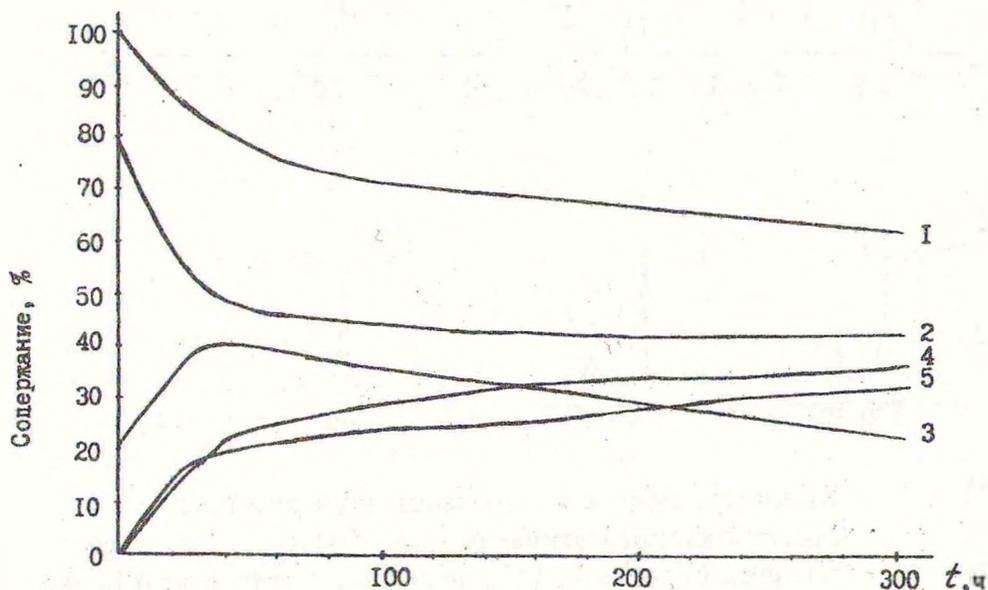


Рис.2. Кинетические кривые восстановления МЭКа коммерческим препаратом пекарских дрожжей в анаэробных условиях: 1 - МЭК без ко-субстрата, 2 - МЭК с ко-субстратом, 3 - ко-субстрат (EtOH), 4 - ВБС без ко-субстрата, 5 - ВБС с ко-субстратом.

Поскольку МИБК не восстанавливался ни при каких условиях, на рис.3 представлены кинетические кривые утилизации МИБК дрожжами *S.cerevisiae* Y1334 в аэробных и анаэробных условиях, свидетельствующие о более высокой скорости и более полной утилизации кетона в присутствии O_2 , как и в случае восстановления МЭКа в аэробных условиях на воде (рис.1).

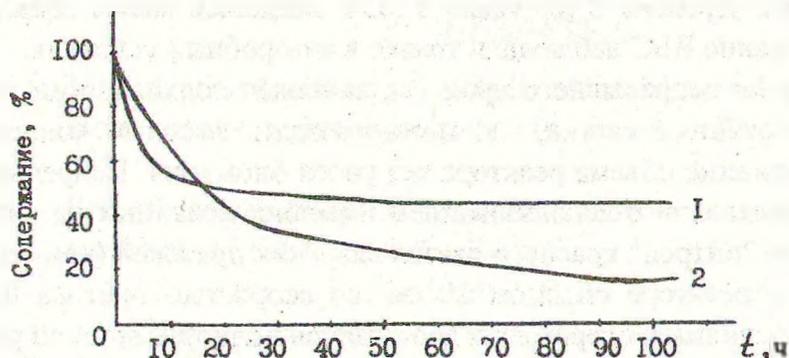


Рис. 3. Кинетические кривые утилизации метилизобутилкетона дрожжами *S.cerevisiae* Y1334 в аэробных и анаэробных условиях: 1 - анаэробные условия, 2 - аэробные условия.

При более длительном проведении процесса с использованием дистиллированной воды и, следовательно, в отсутствие питательных веществ после 150 ч ферментации клетки теряли жизнеспособность. Это заставило нас обратиться к поиску оптимальной среды для проведения непрерывного процесса.

При использовании в качестве среды ферментации ацетатного буфера МИБК не восстанавливался ни в одном из экспериментов, но утилизировался более интенсивно, чем МЭК дрожжами *S.cerevisiae* Y1334 как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

ВБС образовывался с такой же эффективностью, как и в воде при использовании коммерческого препарата дрожжей в анаэробных условиях.

Микроскопические исследования дрожжевых клеток показали, что физиологическое состояние клеток было незначительно лучше, чем в водной среде.

С целью создания условий для нормального функционирования клеток в течение длительного времени и, вместе с тем, ограничения клеточного деления мы использовали модифицированную безазотную среду Ридер, в которой, на наш взгляд, не должно происходить использования кетона в качестве источника углерода для клеточного деления и роста.

Микроскопические исследования показали, что клетки сохраняли свою жизнеспособность в течение 400 ч ферментации (физиологическая активность не изменялась).

МИБК не восстанавливался ни одним из штаммов и ни при каких условиях эксперимента.

Наиболее эффективное образование ВБС наблюдали в анаэробных условиях, в отсутствие косубстрата при использовании коммерческого

препарата дрожжей. Дрожжи *S.cerevisiae* Y1334 оказались менее эффективными, и образование ВБС наблюдали только в анаэробных условиях.

Для проведения непрерывного процесса наиболее подходящими являются иммобилизованные клетки, т.к. можно создать высокую концентрацию клеток в единице объема реактора без уноса биомассы. Непрерывный процесс осуществляли с использованием иммобилизованных на синтетическом волокне "нитрон" красного цвета пекарских дрожжей (коммерческий препарат) в реакторе объемом 20 см^3 со скоростью потока $0,2 \text{ мл/ч}$. Анаэробные условия эксперимента достигались полной загрузкой реактора средой и его герметизацией, а также за счет метаболизации клетками растворенного в среде O_2 . Как видно из рис.4, реактор выходит на стационарный режим работы через 60 ч. Однако степень конверсии МЭКа в ВБС невелика (20%). Физиологическое состояние клеток в течение 500 ч ферментации не изменялось.

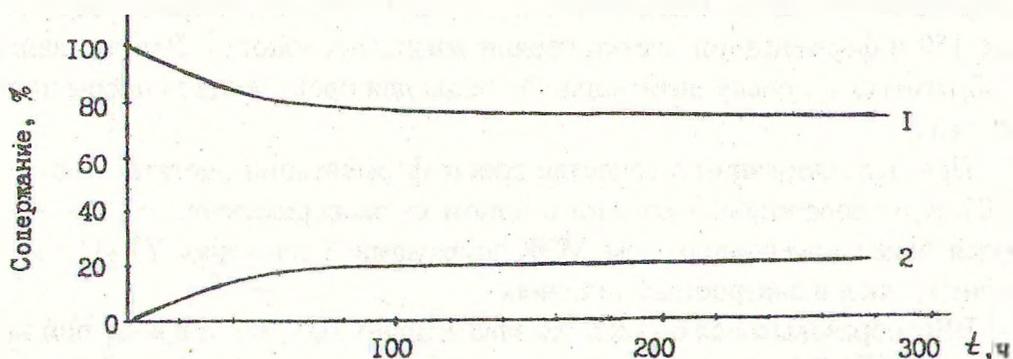


Рис.4. Кинетические кривые восстановления МЭКа коммерческим препаратом пекарских дрожжей в условиях непрерывной ферментации: 1 - концентрация МЭКа, 2 - концентрация ВБС.

Таким образом, для осуществления непрерывного процесса микробиологического восстановления кетонов оптимальными условиями являются:

- использование в качестве субстрата метилэтилкетона;
- использование иммобилизованных дрожжевых клеток (коммерческого препарата пекарских дрожжей);
- использование модифицированной безазотной среды Ридер;
- отсутствие ко субстрата;
- анаэробные условия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mori K. The synthesis of optically active chemical compounds using microorganisms and their enzymes //Chemistry. 1987. - V.42, N 8.-P.562-563.
2. Servi S. Microbial redox enzymes for the enzymatic production of chiral synthons //Synthesis. 1990. - P.1-5.
3. Belan A., Bolte J., Fauve A. et al. Baker's yeast reduction of α -diketones: investigation and control of the enzymatic pathway. //J.Org.Chem. 1987. - V.52.-P.256.
4. Nakamura K., Kawai Y., Kitayama T. et al. Stereochemical control in microbial reduction //Bull.Inst.Chem.Res. 1989. - V.67.-P.157.
5. Ohta H. The reactions of organic synthesis using microorganisms and enzymes //Bio industry. 1988. - V.5, N 8.-P.579-591.
6. Kometani T., Kitatsuji E., Matsuno R. Baker's yeast mediated bioreduction: practical procedure using EtOH as energy source //J.Ferment. and Bioeng. 1991. - V.71, N 3.-P.197-199.

УДК 573.6.086.83;663.1

В.Н.Леонтьев, доцент;
 А.В.Ахрамович, студент;
 Л.В.Пленина, зам.директора;
 С.В.Хлюстов, директор;
 Т.Ф.Кизино, инженер

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОЛИСАХАРИДА - ЦИННАБОРИНА

Antitumour polysaccharide - cinnaborine, produced of micromycetes *Picnoporus cinnaborinus* were isolated and purified. Investigation of structure this polysaccharide has been carried out.

В последние годы отмечается возрастание интереса к полисахаридам микробного происхождения как к потенциальным противоопухолевым средствам. Эти соединения, как правило, нетоксичны и обладают высокой терапевтической активностью и избирательностью.

Целью настоящей работы явился анализ структуры полисахарида - циннаборин, секретлируемого несовершенным грибом *Picnoporus cinnaborinus* и обладающего выраженной противоопухолевой активностью в отношении карциномы Са45.

Максимальный выход циннаборина наблюдается на 142 ч глубинного культивирования гриба на неохмеленном пивном сусле при рН 5,6-5,8 и температуре 26-28°С.