

А. Р. Чанышева (к.х.н., доц.), Н. В. Привалов (асп.),
В. В. Зорин (чл. корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АЦЕТОФЕНОНА НА ЕГО БИОВОССТАНОВЛЕНИЕ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ БИОМАССОЙ *PHASEOLUS VULGARIS*

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; e-mail: aliyach@mail.ru

A. R. Chanysheva, N. V. Privalov, V. V. Zorin

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ACETOPHENONE CONCENTRATION ON ITS BIOREDUCTION CATALYZED BY *PHASEOLUS VULGARIS* BIOMASS

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450064, Ufa, Russia; e-mail: aliyach@mail.ru

Исследовано влияние концентрации ацетофенона (от 0.25 до 5.5 г/л) на выход (*R*)-(+)-1-фенилэтанола, образующегося в ходе его восстановления биомассой *P. vulgaris*. Установлено, что увеличение начальной концентрации ацетофенона с 0.25 до 1.25 г/л приводит к увеличению выхода (росту концентрации) (*R*)-(+)-1-фенилэтанола до 0.52 г/л, при этом его оптическая чистота составляет 70–75 % *ee*. При увеличении концентрации субстрата от 1.5 г/л до 2.75 г/л, концентрация образующегося спирта достигает максимальной величины и составляет 0.55–0.6 г/л при оптической чистоте 74–78 % *ee*. Увеличение начальной концентрации субстрата до 5.5 г/л, соответствующей максимальной его растворимости, приводит к снижению выхода целевого продукта.

Ключевые слова: биовосстановление; биокатализатор; вторичные спирты; (*R*)-(+)-1-фенилэтанол; ферменты; энантиоселективность; энантиоселективный биокатализ.

Оптически активные спирты являются прекурсорами многих практически важных биологически активных соединений. Так, например, *R*- и *S*-энантиомеры ароматических спиртов являются предшественниками низкомолекулярных биорегуляторов и используются в синтезе ценных фармацевтических субстанций^{1–5}. Энантиоселективное восстановление прохиральных карбонильных соединений, катализируемое оксидоредуктазами клеточных культур, представляет собой перспективный и соответствующий принципам «зеленой» химии метод синтеза оптически активных спиртов⁶.

The effect of acetophenone concentration (from 0.25 to 5.5 g/l) on the yield of (*R*)-(+)-1-phenylethanol formed during its reduction by *P. vulgaris* biomass was studied. It was found that an increase in the initial concentration of acetophenone from 0.25 to 1.25 g/l leads to an increase in the yield (increase in concentration) of (*R*)-(+)-1-phenylethanol to 0.52 g/l, while its optical purity is 70–75 % *ee*. With an increase in the concentration of the substrate from 1.5 to 2.75 g/l, the concentration of the resulting alcohol reaches a maximum value and is 0.55–0.6 g/l (74–78 % *ee*). An increase in the initial concentration of the substrate to 5.5 g/l, corresponding to the maximum solubility of the substrate, leads to a decrease in the yield of the product.

Key words: biocatalyst; bioreduction; (*R*)-(+)-1-phenylethanol; enantioselective biocatalysis; enantioselectivity; enzymes; secondary alcohols.

В большинстве случаев при использовании клеток растений для восстановления прохиральных кетонов образуются *S*-энантиомеры вторичных спиртов^{3–6}.

Ранее с целью поиска новых эффективных *R*-оксидоредуктаз нами была исследована возможность биовосстановления модельного прохирального субстрата (ацетофенона) культурами семейства *Fabaceae*. Было установлено, что энантиоселективное восстановление ацетофенона клетками *Phaseolus vulgaris* в течение 72 ч при температуре 23–27 °С и концентрации субстрата 10 ммоль/л приводит к (*R*)-(+)-1-фенилэтанолу с выходом 88% и оптической чистотой 69% *ee*⁷.

Дата поступления 06.08.23

Скорость биовосстановления, энантиоселективность, выход целевых продуктов зависят от условий проведения реакции (температуры, pH, концентрации субстрата, катализатора и др.). Известно, что биокатализ осуществляется через образование фермент-субстратных комплексов. В избытке субстрата количество каталитических центров, способных образовывать фермент-субстратный комплекс, определяется концентрацией фермента. При фиксированной концентрации фермента (количестве катализатора) с увеличением концентрации субстрата происходит насыщение фермента, скорость реакции приближается к максимально возможной.

Кроме того, увеличение концентрации субстрата может приводить к снижению степени превращения, что связано с его токсичностью. Согласно работе⁸ по восстановлению ацетофенона дрожжевыми клетками, степень биокатализируемой трансформации резко снижается, когда концентрация субстрата превышает 27 ммоль/л. Токсичность субстрата при этом подтверждается снижением относительной активности дрожжевых клеток при концентрации ацетофенона свыше 30 ммоль/л.

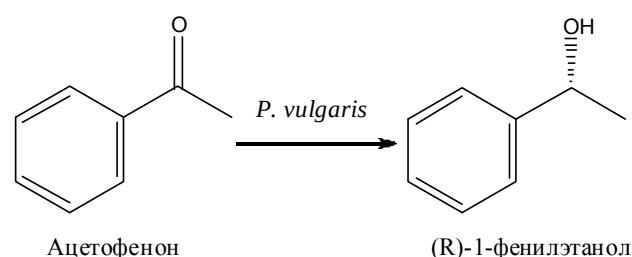
При трансформациях, катализируемых растительными клетками *Daucus carota* (концентрация субстрата 20 ммоль/л), удается достичь достаточно высоких степеней превращения субстрата, однако, при дальнейшем увеличении концентрации ацетофенона конверсия снижается⁹.

В ряде работ при изучении влияния начальной концентрации субстрата на биовосстановление ацетофенона исследовались семена различных растений (*Ligustrum lucidum*, *Phaseolus aureus*

L., *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Ximenia americana*) и оценивалась оптимальная концентрация субстрата (ацетофенона)^{10–14}.

Таким образом, определение соотношения количества катализатора, обладающего определенной удельной активностью, и количества субстрата для создания препаративного энантиоселективного синтеза является актуальной задачей.

В связи с этим в данном исследовании нами было изучено влияние концентрации ацетофенона на выход целевого *R*-(+)-1-фенилэтанола в ходе его биотрансформации цельными клетками *P. vulgaris*. Биовосстановление осуществляли при комнатной температуре (23–27 °C), варьируя концентрацию субстрата в интервале от 0.25 до 5.5 г/л (от 2 до 45.68 ммоль/л):



Установлено, что восстановление ацетофенона при продолжительности трансформации более 48 ч приводит к увеличению выхода, но снижению оптической чистоты продукта, что, по-видимому, связано со стереоинверсией *R*-энантиомера в исходный кетон с последующим его восстановлением в спирт *S*-конфигурации или протеканием побочной реакции, обусловленной контаминацией посторонней микрофлорой (табл.1). Поэтому

Таблица 1

Динамика образования (*R*)-(+)-1-фенилэтанола и изменения его оптической чистоты в ходе биокаталитического восстановления ацетофенона клетками *Phaseolus vulgaris*

Концентрация продукта, г/л / Оптическая чистота, % ee											
Конц-я субстрата, г/л Время реакции, ч	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	2.75
24	0.22/ 74	0.35/ 72	0.47/ 74	0.45/ 74	0.52/ 70	0.55/ 78	0.63/ 74	0.53/ 79	0.53/ 77	0.61/ 76	0.52/ 77
48	0.23/ 57	0.47/ 58	0.68/ 64	0.83/ 70	0.9/ 69	1.08/ 76	1.1/ 71	0.96/ 74	0.99/ 69	1.14/ 68	1.18/ 65
72	0.23/ 32	0.42/ 55	0.69/ 60	0.94/ 68	1.1/ 66	1.27/ 64	1.41/ 64	1.25/ 71	1.2/ 66	1.33/ 62	1.54/ 63
144	0.22/ 16	0.45/ 26	0.72/ 30	0.94/ 25	1.15/ 33	1.29/ 42	1.51/ 36	1.71/ 45	1.73/ 39	1.94/ 39	1.61/ 46
Концентрация продукта, г/л / Оптическая чистота, % ee											
Конц-я субстрата, г/л Время реакции, ч	3	3.25	3.5	3.75	4	4.25	4.5	4.75	5	5.25	5.5
24	0.39/ 77	0.4/ 73	0.4/ 76	0.46/ 77	0.43/ 80	0.45/ 75	0.39/ 79	0.44/ 79	0.41/ 78	0.32/ 76	0.33/ 70
48	0.9/ 74	0.75/ 74	0.8/ 75	0.84/ 77	0.87/ 80	0.8/ 78	0.74/ 80	0.76/ 81	0.78/ 80	0.64/ 78	0.43/ 65
72	1.35/ 63	1.14/ 67	1.14/ 65	1.17/ 65	1.34/ 70	1.22/ 75	1.14/ 80	1.09/ 82	0.94/ 76	0.81/ 73	0.62/ 58
144	1.46/ 42	1.45/ 46	1.57/ 46	1.43/ 50	1.65/ 50	1.66/ 46	1.52/ 54	1.37/ 52	1.42/ 59	1.2/ 51	1.06/ 52

T = 23–27 °C, растворитель – вода (70 мл), биомасса – *P. vulgaris* (15 г)

целесообразным является исследование влияния концентрации субстрата на выход и оптическую чистоту продукта в течение 24 ч биотрансформации.

Увеличение начальной концентрации ацетофенона с 0.25 до 1.25 г/л (2.07–10.38 ммоль/л) приводит к увеличению выхода (росту концентрации) (*R*)-(+)-1-фенилэтанола до 0.52 г/л, при этом оптическая чистота составляет 70–75 % *ee*.

При увеличении концентрации субстрата до 1.5 г/л (12.46 ммоль/л) и дальнейшем увеличении до 2.75 г/л (22.84 ммоль/л), концентрация образующегося спирта достигает максимальной величины 0.55–0.6 г/л (74–78 % *ee*). Увеличение начальной концентрации субстрата до 5.5 г/л (45.68 ммоль/л), соответствующей максимальной растворимости субстрата, приводит к снижению выхода целевого продукта.

Установлено, что в ходе дальнейшей биотрансформации субстрата (48–144 ч) наблюдается существенное снижение его оптической чистоты.

Таким образом, полученные результаты показывают, что достаточно высокие выходы и оптическая чистота (*R*)-(+)-1-фенилэтанола достигаются уже в течение 24 ч при концентрации субстрата (ацетофенона) 0.25–1.25 г/л (2.07–10.38 ммоль/л). При более высоких начальных концентрациях субстрата (1.5–2.75 г/л (14.53–16.61 ммоль/л)) наблюдается максимальный выход (*R*)-(+)-1-фенилэтанола.

За ходом протекания реакции следили хроматографически. Строение (*R*)-(+)-1-фенилэтанола подтверждали с помощью методов ЯМР ^1H и ^{13}C -спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии и поляриметрии.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C записаны на спектрометре Bruker AM-300 (300.13 МГц (^1H), 75.47 МГц (^{13}C)), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМС. Спектры ЯМР ^{13}C записа-

ны в режиме полного подавления по протонам, в режиме JMOD.

Масс-спектральный анализ проводили на хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010S Shimadzu (электронная ионизация при 70 эВ) с использованием капиллярной колонки HP-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура испарителя 280 °С, температура ионизационной камеры 200 °С. Анализ проводили в режиме программирования температуры от 100 до 280 °С со скоростью 20 °С/мин, газ-носитель – гелий (объем потока – 1.1 мл/мин).

Хроматографический анализ проводили на аппаратно-программном комплексе на базе газового хроматографа «Хроматэк-Кристалл-5000.2» с пламенно-ионизационным детектором. Использовали энантиоселективную колонку Astec CHIRALDEXTM В-PM (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм).

Поляриметрический анализ осуществляли на автоматическом поляриметре AA-55 Optical Activity Limited (стандартная длина волны 589 нм).

Получение (*R*)-(+)-1-фенилэтанола. Ацетофенон (0.25–5.5 г/л) и биокатализатор на основе клеток *P. vulgaris* (15 г) вносили в колбу с 70 мл воды. Реакционную смесь помещали в орбитальный шейкер (150 об./мин) и перемешивали при температуре 23–27 °С. По достижении необходимой конверсии суспензию (1 мл) отбирали из реакционной среды, фильтровали, биомассу промывали три раза водой. Фильтраты экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Объединенные вытяжки сушили над безводным MgSO_4 . Степень конверсии субстрата определяли методом газожидкостной хроматографии.

1-Фенилэтанол. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.40 д (3H, CH_3), 4.71–4.77 м (1H, CH), 7.22–7.42 м (5H, CH_{Ar}). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м. д.: 25.18 (1C, CH_3), 70.05 (1C, CH), 125.34 (2C, CH_{Ar}), 127.18 (1C, CH_{Ar}), 128.28 (2C, CH_{Ar}), 145.92 (1C, CH_{Ar}). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 122 ($[\text{M}]^+$, 30), 107 (85), 79 (100), 78 (23), 77 (57), 51 (23), 50 (11), 44 (17), 43 (39), 39 (10).

Литература

1. Demmel G.I., Bordon D.L., Vazquez A.M., Rossi, L.I., Aimar M.L. Optimisation, scope and advantages of the synthesis of chiral phenylethanols using whole seeds of *Bauhinia variegata* L. (*Fabaceae*) as a new and stereoselective bioreducer of carbonyl compounds // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2020. – Pp.1-15.
2. Chanysheva A.R., Vorobyova E.N., Zorin V.V. Enantioselective Bioreduction of Acetophenone into (*R*)- and (*S*)-1-Phenylethanols // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2017. – V.87, №13. – Pp.3259-3262.
3. Чанышева А.Р., Шейко Е.А., Юсупова Ю.К., Зорин В.В. Стереоселективное биовосстановление *p*-ме-

References

1. Demmel G.I., Bordon D.L., Vazquez A.M., Rossi, L.I., Aimar M.L. [Optimisation, scope and advantages of the synthesis of chiral phenylethanols using whole seeds of *Bauhinia variegata* L. (*Fabaceae*) as a new and stereoselective bioreducer of carbonyl compounds]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2020, pp.1-15.
2. Chanysheva A.R., Vorobyova E.N., Zorin V.V. [Enantioselective Bioreduction of Acetophenone into (*R*)- and (*S*)-1-Phenylethanols]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, vol.87, no.13, pp. 3259-3262.
3. Chanysheva A.R., Sheyko E.A., Yusupova Y.K., Zorin V.V. *Stereoselektivnoye biovosstanovleniye p-metoksiatsetofenona v (S)-1-(4-metoksifenil)etanol*

- токсиацетофенона в (S)-1-(4-метоксифенил)этанол // Баш. хим. ж. – 2019. – Т.26, №2. – С.44-47.
4. Чанышева А.Р., Юсупова Ю.К., Привалов Н.В., Зорин В.В. Оптимизация кеторедуктазной активности ферментов *Petroselinum crispum* для синтеза (S)-1-(4-метоксифенил)этанола // Баш. хим. ж. – 2020. – Т.27, №1. – С.32-35.
 5. Chanysheva A.R., Sufiyarova A.L., Privalov N.V., Zorin V.V. Enantioselective synthesis of (S)-(-)-1-(4-fluorophenyl)ethanol // ChemChemTech. – 2022. – Т.65, №8. – С.111-116.
 6. Patel R.N. Green biocatalysis. – Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2016. – 792 p.
 7. Чанышева А.Р., Привалов Н.В., Зорин В.В. Поиск перспективных биокатализаторов для энантиоселективного восстановления прохиральных карбонильных соединений // Экол. Хим. – 2023. – Т.32, №5. – С.280-284.
 8. Yang Z.H., Zeng R., Chang X., Li X.K., Wang G.H. Toxicity of Aromatic Ketone to Yeast Cell and Improvement of the Asymmetric Reduction of Aromatic Ketone Catalyzed by Yeast Cell with the Introduction of Resin Adsorption // Food Technol. Biotechnol. – 2008. – V.46, №3. – Pp.322-327.
 9. Chang X., Yang Z., Zeng R., Yang G., Yan J. Production of Chiral Aromatic Alcohol by Asymmetric Reduction with Vegetable Catalyst // Chinese Journal of Chemical Engineering. – 2010. – V.18, №6. – Pp.1029-1033.
 10. Bordon D. L., Vazquez A. M., Decarlina M. F., Demmel G. I., Rossi L. I., Aimar M. L. Optimisation of the bioreduction process of carbonyl compounds promoted by seeds of glossy privet (*Ligustrum lucidum* – Oleaceae) and its application to the synthesis of key intermediates // Biocatalysis and Biotransformation. – 2021. – V.39, №1. – Pp.1-15.
 11. Kumaraswamy G., Ramesh S. Soaked *Phaseolus aureus* L: an efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones // Green Chem. – 2003. – V.5, №3. – Pp.306-308.
 12. Ferreira D.A., da Silva R.C., da Costa Assuncao J.C., de Mattos M.C., Lemos T.L.G., Queiroz Monte F.J. *Lens culinaris*: A new biocatalyst for reducing carbonyl and nitro groups // Biotechnol. Bioproc. E. – 2012. – V.17. – Pp.407-412.
 13. Bertini L.M., Lemos T.L.G., Alves L.A., Queiroz Monte F.J., de Mattos M.C., de Oliveira M. Soybean (*Glycine max*) as a versatile biocatalyst for organic synthesis // Afr. J. Biotech. – 2012. – V.11, №30. – Pp.7766-7770.
 14. Silva R., Mesquita B.M., Farias I.F., Nascimento P.G., Lemos T.L.G., Monte F.J. Enzymatic chemical transformations of aldehydes, ketones, esters and alcohols using plant fragments as the only biocatalyst: *Ximenia americana* grains // Molecular Catalysis. – 2018. – V.445. – Pp.187-194.
 - [Stereoselective bioreduction of *p*-methoxyacetophenone in (S)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], , 2019, vol.26, no.2, pp.44-47.
 4. Chanysheva A.R., Yusupova Yu.K., Privalov N.V., Zorin V.V. *Optimizatsiya kеторедуктазной активности ферментов Petroselinum crispum dlya sinteza (S)-1-(4-metoksifenil)etanola* [Optimization of the ketoreductase activity of *Petroselinum crispum* enzymes for the synthesis of (S)-1-(4-methoxyphenyl) ethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2020, vol.27, no.1, pp.32-35.
 5. Chanysheva A.R., Sufiyarova A.L., Privalov N.V., Zorin V.V. [Enantioselective synthesis of (S)-(-)-1-(4-fluorophenyl)ethanol]. *ChemChemTech*, 2022, vol.65, no.8, pp.111-116.
 6. Patel R.N. [Green biocatalysis]. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2016, 792 p.
 7. Chanysheva A.R., Privalov N.V., Zorin V.V. *Poisk perspektivnykh biokatalizatorov dlya enantioselektivnogo vosstanovleniya prohiral'nykh karbonil'nykh soedineniy* [Screening of Promising Biocatalysts for Enantioselective Reduction of Prochiral Carbonyl Compounds]. *Ekologicheskaya khimiya* [Ecological Chemistry], 2023, vol.32, no.5, pp.280-284.
 8. Yang Z.H., Zeng R., Chang X., Li X.K., Wang G.H. [Toxicity of Aromatic Ketone to Yeast Cell and Improvement of the Asymmetric Reduction of Aromatic Ketone Catalyzed by Yeast Cell with the Introduction of Resin Adsorption]. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, vol.46, no.3, pp.322-327.
 9. Chang X., Yang Z., Zeng R., Yang G., Yan J. [Production of Chiral Aromatic Alcohol by Asymmetric Reduction with Vegetable Catalyst]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2010, vol.18, no.6, pp.1029-1033.
 10. Bordon D. L., Vazquez A. M., Decarlina M. F., Demmel G. I., Rossi L. I., Aimar M. L. [Optimisation of the bioreduction process of carbonyl compounds promoted by seeds of glossy privet (*Ligustrum lucidum* – Oleaceae) and its application to the synthesis of key intermediates]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2021, vol.39, no.1, pp.1-15.
 11. Kumaraswamy G., Ramesh S. [Soaked *Phaseolus aureus* L: an efficient biocatalyst for asymmetric reduction of prochiral aromatic ketones]. *Green Chem.*, 2003, vol.5, no.3, pp.306-308.
 12. Ferreira D.A., da Silva R.C., da Costa Assuncao J.C., de Mattos M.C., Lemos T.L.G., Queiroz Monte F.J. [*Lens culinaris*: A new biocatalyst for reducing carbonyl and nitro groups]. *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2012, vol.17, pp.407-412.
 13. Bertini L.M., Lemos T.L.G., Alves L.A., Queiroz Monte F.J., de Mattos M.C., de Oliveira M. [Soybean (*Glycine max*) as a versatile biocatalyst for organic synthesis]. *Afr. J. Biotech.*, 2012, vol.11, no.30, pp.7766-7770.
 14. Silva R., Mesquita B.M., Farias I.F., Nascimento P.G., Lemos T.L.G., Monte F.J. [Enzymatic chemical transformations of aldehydes, ketones, esters and alcohols using plant fragments as the only biocatalyst: *Ximenia americana* grains]. *Molecular Catalysis*, 2018, vol.445, pp.187-194.