

А. Р. Чанышева (к.х.н., доц.)¹, Н. В. Привалов (асп.)¹,
В. В. Зорин (чл. корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)^{1,2}

СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОЕ БИОВОССТАНОВЛЕНИЕ ГЕПТАН-2-ОНА И ОКТАН-2-ОНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ КЛЕТКАМИ *PETROSELINUM CRISPUM*

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

² Академия наук Республики Башкортостан, отделение химических технологий и новых материалов
450008, г. Уфа, ул. Кирова, 15; e-mail: btmtf@mail.ru

A. R. Chanysheva¹, N. V. Privalov¹, V. V. Zorin^{1,2}

STEREOSELECTIVE BIOREDUCTION OF HEPTAN-2-ONE AND OCTAN-2-ONE CATALYZED BY *PETROSELINUM CRISPUM* CELLS

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

² Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan
15, Kirova Str. 450008, Ufa, Russia; e-mail: btmtf@mail.ru

Изучена возможность биотрансформации прохиральных гептан-2-она и октан-2-она в энантиомерно чистые (2*S*)-(+)-гептан-2-ол и (2*S*)-(+)-октан-2-ол с использованием клеток *P. crispum*. Найдены условия, позволяющие получать в течение 24 ч (2*S*)-(+)-гептан-2-ол с высокими выходами 99% и энантиомерным избытком 98% *ee*. Установлено, что трансформация октан-2-она в течение 72 ч приводит к образованию соответствующего спирта с выходом 67% (74% *ee*). Проведена оптимизация условий биовосстановления октан-2-она в присутствии различных экзогенных восстановителей: этанола (1–5 %), изопропанола (1–5 %) или глюкозы (эквимолярное количество). Максимальные выход (78%) и оптическая чистота (93% *ee*) (2*S*)-(+)-октан-2-ола достигается в присутствии 3% этанола в течение 48 ч. Восстановление октан-2-она в присутствии изопропанола (1–5 %) или эквимолярного количества глюкозы позволяет несколько повысить выход и/или оптическую чистоту (2*S*)-октан-2-ола по сравнению с биотрансформацией в отсутствие экзогенного восстановителя.

Ключевые слова: гептан-2-он; (2*S*)-гептан-2-ол; октан-2-он; (2*S*)-октан-2-ол; стереоселективное биовосстановление; энантиоселективный биокатализ.

Энантиомерно чистые вторичные алифатические (2*S*)-гептан-2-ол и (2*S*)-октан-2-ол являются ценными полупродуктами в синтезе лекарственных препаратов, обладающих противоастма-

The possibility of biotransformation of prochiral heptan-2-one and octan-2-one into enantiomerically pure (2*S*)-(+)-heptan-2-ol and (2*S*)-(+)-octan-2-ol using *P. crispum* cells was studied. We found conditions that allow obtaining (2*S*)-(+)-heptan-2-ol with a high yield of 99% and an enantiomeric excess of 98% *ee* within 24 hours. It was found that transformation of octan-2-one within 72 hours leads to the formation of the corresponding alcohol with a yield of 67% (74% *ee*). Optimization of the conditions for bioreduction of octan-2-one in the presence of various exogenous reducing agents: ethanol (1–5 %), isopropanol (1–5 %) or glucose (equimolar amount) was carried out. The maximum yield and optical purity of (2*S*)-(+)-octan-2-ol is achieved in the presence of 3% ethanol 78% (93% *ee*) for 48 h. Reduction of octan-2-one in the presence of isopropanol (1–5 %) or an equimolar amount of glucose allows to slightly increase the yield and/or optical purity of (2*S*)-octan-2-ol in comparison with biotransformation in the absence of an exogenous reducing agent.

Key words: enantioselective biocatalysis; heptan-2-one; octan-2-one; (2*S*)-heptan-2-ol; (2*S*)-octan-2-ol; stereoselective bioreduction.

тическим, противомикробным, противоопухолевым и противоаллергенным действием, а также широко используются в агропромышленности и в производстве парфюмерной продукции^{1,2}.

Дата поступления 14.09.24

Ранее нами была показана возможность биотрансформации гептан-2-она и октан-2-она в энантиомерно чистые (2*S*)-(+)-гептан-2-ол и (2*S*)-(+)-октан-2-ол с использованием клеток *D. carota* и найдены условия, позволяющие получать (2*S*)-(+)-гептан-2-ол с выходом 91% (98% *ee*) и (2*S*)-(+)-октан-2-ол с выходом 95% (97% *ee*) (схема 1) ³.

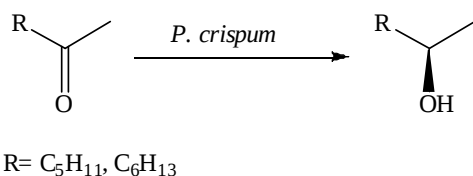


Схема 1

В данном исследовании нами была изучена возможность стереонаправленного синтеза (2*S*)-(+)-гептан-2-ола и (2*S*)-(+)-октан-2-ола путем энантиоселективного биовосстановления прохиральных гептан-2-она и октан-2-она с участием клеток петрушки кудрявой *P. crispum* в условиях, аналогичных описанным ранее в ходе биокаталитического восстановления соответствующих кетонов ³.

Установлено, что биовосстановление исходного гептан-2-она, катализируемое клетками *P. crispum* в воде при комнатной температуре, уже в течение 24 ч приводит к образованию (2*S*)-(+)-гептан-2-ола с выходом 99% и энантиомерным избытком 99% *ee*. Сопоставление результатов с данными, полученными при проведении трансформации, катализируемой клетками *D. carota*, показывает, что биокатализатор на основе клеток *P. crispum* является более эффективным и позволяет получить (2*S*)-(+)-гептан-2-ол с высокими выходом и энантиомерным избытком.

Известно ⁴, что на глубоких степенях конверсии биовосстановления возможно протекание стереоинверсии, приводящей к *R*-энантиомерам вторичных спиртов. Большинство реакций биовосстановления несимметричных кетонов протекает с образованием вторичных спиртов *S*-конфигурации ^{5–10}. В литературе имеется лишь несколько примеров трансформаций, приводящих к *R*-энантиомерам вторичных спиртов, являющихся ценными прекурсорами в синтезе низкомолекулярных биорегуляторов ^{11, 12}.

В связи с этим нами была исследована возможность биовосстановления гептан-2-она на глубоких степенях конверсии.

Установлено, что при дальнейшей биотрансформации (144 ч) выход (2*S*)-(+)-гептан-2-ола снижается и составляет 58% (72% *ee*), при этом возрастает концентрация исходного кетона (табл.

1), однако образования спирта *R*-конфигурации не наблюдается.

Таблица 1
Зависимость выхода и оптической чистоты (2*S*)-(+)-гептан-2-ола от продолжительности биовосстановления гептан-2-она с участием биокатализатора *P. crispum*

Время, ч			
24	48	72	144
Выход, %/ <i>ee</i> , %			
99/99	99/99	87/86	58/72

T = 20–25 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

В отличие от гептан-2-она, восстановление октан-2-она, катализируемое клетками *P. crispum*, в течение 24 ч дает (2*S*)-(+)-октан-2-ол с удовлетворительным выходом 24% (45% *ee*), дальнейшая трансформация в течение 72 ч приводит к увеличению выхода и энантиомерного избытка соответствующего спирта до 67% (74% *ee*), а трансформация в течение 144 ч приводит к увеличению выхода (2*S*)-(+)-октан-2-ола до 96%, однако при этом наблюдается снижение оптической чистоты спирта до 30% *ee* (табл. 2).

Таблица 2
Зависимость выхода и оптической чистоты (2*S*)-(+)-октан-2-ола от продолжительности биовосстановления октан-2-она с участием биокатализатора *P. crispum* в присутствии этанола

Конц-я этанола, %	Время, ч			
	24	48	72	144
	Выход, %/ <i>ee</i> , %			
0	24/45	33/53	67/74	96/30
1	25/99	33/97	78/97	45/99
2	21/98	73/97	56/99	48/99
3	35/91	78/93	62/94	51/98
4	52/99	68/93	32/97	29/90
5	22/99	68/99	43/98	28/99

T = 20–25 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

С целью разработки более эффективного метода получения (2*S*)-(+)-октан-2-ола с участием биокатализатора *P. crispum* нами была исследована трансформация октан-2-она в присутствии экзогенных восстановителей (изопропанола, этанола или глюкозы), которые могут эффективно влиять на энантиоселективность восстановления исходных кетонов.

Было обнаружено, что в случае использования 1–4% этанола в качестве экзогенного восстановителя в течение 48 ч образуется (2*S*)-(+)-октан-

2-ол с выходом 33–78 % (93–99 % *ee*). Максимальный выход и оптическая чистота (*S*)-(+)-октан-2-ола – 78% (93% *ee*) – достигается в присутствии 3% этанола в течение 48 ч (табл. 2). При дальнейшей биотрансформации (144 ч) в присутствии 1–4 % этанола выход (*S*)-(+)-октан-2-ола снижается и составляет 28–51 % (90–99 % *ee*), при этом возрастает концентрация исходного кетона (табл. 3), что, по-видимому, связано с тем, что в условиях снижения NADH (NADPH) и накопления NAD⁺ (NADP⁺) и ацетальдегида (продукта окисления экзогенного восстановителя – этанола) в ходе реакции ферменты, катализирующие реакции восстановления, работают как дегидрогеназы, окисляющие вторичные спирты в карбонилсодержащие соединения.

Восстановление октан-2-она в присутствии изопропанола (1–5 %) или эквимольного количества глюкозы позволяет в некоторых случаях несколько повысить выход и/или оптическую чистоту (2*S*)-октан-2-ола по сравнению с биотрансформацией в отсутствие экзогенного восстановителя (табл. 3, 4).

Таблица 3
Зависимость выхода и оптической чистоты (*S*)-(+)-октан-2-ола от продолжительности биовосстановления октан-2-она с помощью биокатализатора *P. crispum* в присутствии изопропанола

Конц-я изопропанола, %	Время, ч			
	24	48	72	144
	Выход, %/ <i>ee</i> , %			
0	24/45	33/53	67/74	96/30
1	32/98	44/97	77/38	90/23
2	35/96	63/97	73/47	92/24
3	38/97	89/40	93/35	94/41
4	36/95	73/42	93/38	95/27
5	34/98	90/33	93/35	96/31

T = 20–25 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

Таблица 4
Зависимость выхода и оптической чистоты (*S*)-(+)-октан-2-ола от продолжительности биовосстановления октан-2-она клетками *P. crispum* в присутствии глюкозы

Время, ч	24	48	72	144
	Выход, %/ <i>ee</i> , %			
Без добавления глюкозы	24/45	33/53	67/74	96/30
С глюкозой	92/27	96/29	98/41	99/46

T = 20–25 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

За ходом протекания реакций следили хроматографически, используя заведомо синтезированные образцы рацемических (*R*, *S*)-гептан- и октан-2-ола с применением энантиоселективной колонки AstecChiraldexb-PM (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм).

Строение (*S*)-(+)-гептан-2-ола и (*S*)-(+)-октан-2-ола подтверждали с помощью методов ЯМР ¹H и ¹³C-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии и поляриметрии.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C записаны на спектрометре Bruker AM-300 и AMX-300 (рабочая частота для записи ЯМР ¹H – 300 МГц, для ЯМР ¹³C – 75 МГц), в качестве внутреннего стандарта использовали для ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C – ТМС. Спектры ЯМР ¹³C записаны 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, диапазон детектируемых масс 33-500 Да) с использованием капиллярной колонки HP-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура испарителя 280 °C, температура ионизационной камеры 200 °C. Анализ проводили в режиме программирования температуры от 100 до 280 °C со скоростью 20 °C/мин, газ-носитель – гелий (объем потока – 1.1 мл/мин).

Поляриметрический анализ осуществляли на автоматическом поляриметре «Optical Activity Limited» модели AA-55 с галогеновой лампой (стандартная длина волны 589 нм) в хлороформе.

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

Получение (2S)-(+)-гептан-2-ола и (2S)-(+)-октан-2-ола.

Кетон (0.1 г) и биокатализатор на основе клеток *P. crispum* (15 г) вносили в колбу с 70 мл воды. Реакционную смесь помещали в орбитальный шейкер (150 об./мин) и перемешивали при комнатной температуре. По достижении необходимой конверсии суспензию отбирали из реакционной среды, фильтровали, биомассу промывали три раза водой. Фильтраты экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Объединенные вытяжки сушили над безводным MgSO₄. Степень конверсии субстрата определяли методом газожидкостной хроматографии. Спектральные характеристики (2*S*)-(+)-гептан-2-ола и (2*S*)-(+)-октан-2-ола совпадают с литературными данными³.

Литература

1. Liese A., Zelinski T., Kula M.-R., Kierkels H., Karutz M., Kragl U., Wandrey C. A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* – 1998. – №4. – Pp.91-99.
2. Ching T. Hou. Handbook of Industrial Biocatalysis. – CRC Press: Boca Raton, 2005. – 283 p.
3. Chanysheva A.R., Zorin V.V. Enantioselective bioreduction of heptan-2-one and octan-2-one catalyzed by *Daucus carota* cells // *Indian Journal of Chemistry.* – 2020. – V.59B. – Pp.1381-1383.
4. Зорин В.В., Петухова Н.И., Шахмаев Р.Н., Василова Л.Я., Чанышева А.Р., Зорин А.В., Сунагатуллина А.Ш., Халимова Л.Х. Основы исследований в области стерео- и регионаправленного биокатализа и органического синтеза биологически активных веществ. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2018. – 286 с.
5. Hamada H., Nakamura N., Kawabe S., Funamoto T. Enantioselectivity in the reduction of α -dicarvelone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* // *Phytochemistry.* – 1988. – V.27. – Pp.3807-3808.
6. Ishihara K., Hamada H., Hirata T., Nakajima N. Biotransformation using plant cultured cells // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2003. – V.23. – Pp.145-170.
7. Chanysheva A.R., Sufiyarova A.L., Privalov N.V., Zorin V.V. Enantioselective synthesis of (S)-(-)-1-(4-fluorophenyl)ethanol // *ChemChemTech.* – 2022. – T.65, №8. – С.111-116.
8. Чанышева А. Р., Шейко Е. А., Юсупова Ю.К., Зорин В. В. Стереоселективное биовосстановление *p*-метоксиацетофенона в (S)-1-(4-метоксифенил)этанол // *Баш. хим. ж.* – 2019. – Т.26, №2. – С.44-47.
9. Chanysheva A.R., Privalov N.V., Zorin V.V. Enantioselective Biocatalytic Reduction of Hexan-2-one, catalyzed by *Petroselinum crispum* Cells // *Russian Journal of General Chemistry.* – 2020. – V.90. – Pp.2542-2545.
10. Чанышева А.Р., Шейко Е.А., Зорин В.В. Асимметрическое биовосстановление 4-хлорацетофенона, катализируемое клетками *Daucus carota*, в воде и органических растворителях // *Экологическая химия.* – 2021. – Т.30, №6. – С.301-305.
11. Чанышева А.Р., Привалов Н.В., Зорин В.В. Поиск перспективных биокатализаторов для энантиоселективного восстановления прохиральных карбонильных соединений // *Экологическая химия.* – 2023. – Т.32, №5. – С.280-284.
12. Чанышева А.Р., Привалов Н.В., Зорин В.В. Стереонаправленный синтез (R)-(+)-1-(4-нитрофенил)этанола // *Баш. хим. ж.* – 2024. – Т.31, №2. – С.15-17.

References

1. Liese A., Zelinski T., Kula M.-R., Kierkels H., Karutz M., Kragl U., Wandrey C. [A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones]. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1998, no.4, pp.91-99.
2. Ching T. Hou. [Handbook of Industrial Biocatalysis]. CRC Press, Boca Raton, 2005, 283 p.
3. Chanysheva A.R., Zorin V.V. [Enantioselective bioreduction of heptan-2-one and octan-2-one catalyzed by *Daucus carota* cells]. *Indian Journal of Chemistry*, 2020, vol.59B, pp.1381-1383.
4. Zorin V.V., Petukhova N.I., Shakhmaev R.N., Vasilova L.Ya., Chanysheva A.R., Zorin A.V., Sunagatullina A.Sh., Khalimova L.Kh. *Osnovy issledovaniy v oblasti stereo- i regionapravlennoy biokataliza i organicheskogo sinteza biologicheskii aktivnykh veshchestv* [Fundamentals of research in the field of stereo- and region-directed biocatalysis and organic synthesis of biologically active substances]. Ufa, USPTU Publ., 2018, 286 p.
5. Hamada H., Nakamura N., Kawabe S., Funamoto T. [Enantioselectivity in the reduction of α -dicarvelone by cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*]. *Phytochemistry*, 1988, vol.27, pp.3807-3808.
6. Ishihara K., Hamada H., Hirata T., Nakajima N. [Biotransformation using plant cultured cells]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003, vol.23, pp.145-170.
7. 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.
8. Chanysheva A. R.; Sheiko E. A.; Yusupova Y. K.; Zorin V. V. *Stereoselektivnoye biovosstanovleniye p-metoksi atsetofenona v (S)-1-(4-metoksifenil)etanol* [Stereo-selective bioreduction of *p*-methoxyacetophenone into (S)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2019, vol.26, no.2, pp.44-47.
9. Chanysheva A.R., Privalov N.V., Zorin V.V. [Enantioselective Biocatalytic Reduction of Hexan-2-one, Catalyzed by *Petroselinum crispum* Cells]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2020, vol. 90, pp. 2542-2545.
10. Chanysheva A.R., Sheiko E.A., Zorin, V.V. [Asymmetric bioreduction of 4-chloroacetophenone catalyzed by *Daucus carota* cells in water and organic solvents]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2021, vol. 91, no 13, pp. 2953-2956.
11. Chanysheva A.R., Privalov N.V., Zorin V.V. [Screening of promising biocatalysts for enantioselective reduction of prochiral carbonyl compounds]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2023, vol.93, no.13, pp.3460-3463.
12. Chanysheva A.R., Privalov N.V., Zorin V.V. *Stereonapravlennyi sintez (R)-(+)-1-(4-nitrofenil)etanol* [Stereo-directed synthesis of (R)-(+)-1-(4-nitrophenyl)ethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2024, vol.31, no.2, pp.15-17.