Е. А. Шейко (магистрант), Е. Э. Медникова (магистрант),
Т. Е. Воробьева (магистрант), А. Р. Чанышева (к.х.н., доц.)

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО БИОВОССТАНОВЛЕНИЯ АЦЕТОФЕНОНА В (S)-(-)-1-ФЕНИЛЭТАНОЛ

Уфимский государственный нефтяной технический университет,
кафедра биохимии и технологии микробиологических производств,
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; тел. (347) 2431935, e-mail: aliyach@mail.ru

E. A. Sheiko, E. E. Mednikova, T. E. Vorobyeva, A. R. Chanysheva

INVESTIGATION OF ENANTIOSELECTIVE BIOREDUCTION CONDITIONS OF ACETOPHENONE TO (S)-(-)-1-PHENYLETHANOL

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia; ph. (347) 2431935, e-mail: aliyach@mail.ru

Исследовано влияние температуры на энантиоселективное биовосстановление ацетофенона до соответствующего спирта ((S)-(-)-1-фенилэтанола) в присутствии клеток *D. carota*. Показано, что наиболее эффективно восстановление ацетофенона под действием клеток *D. carota* протекает при комнатной температуре с образованием (S)-(-)-1-фенилэтанола с выходом 75% и оптической чистотой 97% *ee*. Повышение температуры до 37 °C, как и понижение до 10 °C и 0 °C приводит к снижению выхода продукта в 2-3 раза.

Ключевые слова: ацетофенон; биовосстановление; вторичные спирты; низкомолекулярные биорегуляторы; ферменты; энантиоселективный биокатализ; (S)-(-)-1-фенилэтанол.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности (№4.6451.2017/8.9).

(R)- и (S)-энантиомеры 1-фенилэтанола, а также их производные являются важными предшественниками низкомолекулярных биорегуляторов и используются в синтезе фармацевтических препаратов, проявляющих антидепрессантное, антирабическое и антидиабетическое действие¹⁻⁵, а также агрохимикатов. R-1-(+)-Фенилэтанол применяется в офтальмологии, а также ингибирует адсорбцию холестерина в желудочно-кишечном тракте². На основе производных (S)-(-)-1-фенилэтанол

The influence of temperature on the enantioselective bioreduction of acetophenone to the corresponding alcohol ((S)-(-)-1-phenylethanol) in the presence of *D. carota* cells was studied. It was shown that the most effective reduction of acetophenone under the action of *D. carota* cells proceeds at room temperature with the formation of (S)-(-)-1-phenylethanol with a yield of 75% and an optical purity of 97% *ee*. Increasing the temperature to 37 °C and decreasing to 10 °C and 0 °C leads to a decrease in product yield by 2-3 times.

Key words: acetophenone; bioreduction; enantioselective biocatalysis; secondary alcohols; low-molecular bioregulators; enzymes; enantioselective biocatalysis; (S)-(-)-1-phenylethanol.

This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia in the framework of the state task in the field of scientific activity (№4.6451.2017 / 8.9).

ла осуществляют синтез оптически активных полимеров, используемых для разделения рацемических смесей органических веществ. (S)-(-)-1-фенилэтанол также применяют для получения жидких кристаллов^{1, 2}.

Синтез оптически чистых вторичных спиртов требует специальных подходов. Энантиоселективное биовосстановление прохиральных карбонильных соединений с использованием клеток открывает новые возможности в стереонаправленном синтезе и является перспективным для получения энантиомерно чистых вторичных спиртов³⁻¹⁶.

Дата поступления 13.01.18

Известно, что скорость биовосстановления, его энантиоселективность и выходы целевых продуктов существенно зависят от условий проведения реакции (рН, температура, полярность растворителя, косубстраты и др.).

С целью изучения условий получения оптически активного (*S*)-(-)-1-фенилэтанола нами исследовано влияние температуры на восстановление ацетофенона в присутствии культуры *D. carota*.

Установлено, что восстановление ацетофенона с участием биокатализатора *D. carota* в воде при комнатной температуре в течение 144 ч, приводит к образованию (*S*)-(-)-1-фенилэтанола с выходом 75% и оптической чистотой 97% *ee*.

При восстановлении ацетофенона в воде при температуре 37 °С в течение 144 ч выход целевого (*S*)-(-)-1-фенилэтанола снижается и составляет 24%.

Вероятно, это связано с частичной денатурацией ферментов клеток *D. carota*, обладающих оксидоредуктазной активностью.

При понижении температуры реакции до 10 °С и 0 °С скорость биовосстановления и выход *S*-энантиомерных спиртов также уменьшается в 2–3 раза, при этом оптическая чистота продукта остается на том же уровне.

За ходом протекания реакций следили хроматографически, используя заведомо синтезированные образцы рацемического фенилэтанола с применением энантиоселективной колонки Astec CHIRALDEXTM В-РМ (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм), на которой время удерживания (*R*)-(+)-1-фенилэтанола меньше, чем (*S*)-(-)-1-фенилэтанола.

Строение (*S*)-(-)-1-фенилэтанола подтверждали с помощью методов ЯМР ¹Н и ¹³С-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Конфигурация (*S*)-(-)-1-фенилэтанола была подтверждена поляриметрически.

Таким образом, наиболее эффективное восстановление ацетофенона в присутствии клеток *D. carota* протекает при комнатной температуре, что позволяет получать (*S*)-(-)-1-фенилэтанол с выходом 75% и оптической чистотой 97% *ee*.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹Н и ЯМР ¹³С записаны на спектрометре Bruker AM-300 (300.13 МГц (¹Н), 75.47 МГц (¹³С)), в качестве внутреннего стандарта использовали для ЯМР ¹Н и ЯМР ¹³С – ТМС. Спектры ЯМР ¹³С 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) 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-РМ (30 м × 0.25 мм × 0.12 мкм).

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

Получение (*S*)-(-)-1-фенилэтанола.

Ацетофенон (0.1 г) добавляли в суспензию биокатализатора *D. carota* (15 г) в 70 мл воды, и реакционную смесь помещали в орбитальный шейкер (150 об/мин) и перемешивали при различных температурах в течение 144 ч. Суспензию фильтровали, биомассу промывали три раза водой. Фильтраты экстрагировали диэтиловым эфиром (3×125 мл). Эфирные вытяжки сушили Na₂SO₄ и отгоняли на роторно-пленочном испарителе.

(*S*)-(-)-1-Фенилэтанол.

Спектр ЯМР ¹Н, δ, м. д.: 1.42–1.49 д (3H, CH₃), 2.6 с (1H, OH), 4.2–4.4 к (1H, CH), 7.2–7.35 м (5H, CH_{Ar}). Спектр ЯМР ¹³С, δ, м. д.: 20.28 (C, CH₃), 70.35 (C, CH), 125.27 (2C, CH_{Ar}), 127.35 (C, CH_{Ar}), 128.12 (2C, CH_{Ar}), 145.8 (C, CH_{Ar}). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 105.1(100), 77.1(93.8), 51.1(36.7), 120.1(32.9), 79.1(26.4), 107.1(25.3), 43.0(21.7), 78.1(14.0), 50.1(13.7), 122.2(9.7).

Синтез рацемического (*R*),(*S*)-1-фенилэтанола осуществляли по известной методике ¹⁷.

Литература

1. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений.— Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000.— 664с.
2. Suan C.L., Sarmidi M.R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R*, *S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.— 2004.— V.28, №2-3.— Pp.111-119.
3. Lappin G.J., Stride J.D., Tampion J. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* // *Phytochemistry*.— 1987.— V.26.— Pp.995-997.
4. 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.
5. Suga T., Lee Y.S., Hirata T. The hydroxylation of β -terpineol and its acetate with the cultured cells of *Nicotiana tabacum* // *Bulletin of the Chemical Society of Japan*.— 1983.— V.56.— Pp.784-787.
6. Pawlowicz P., Siewinski A. Enantioselective hydrolysis of esters and the oxidation of aromatic-aliphatic alcohols obtained there from by *Spirodela oligorrhiza* // *Phytochemistry*.— 1987.— V.26.— Pp.1001-1004.
7. Patel R., Namee C.G., Banerjee A., Howell J.M., Robison R.S., Szarka L.J. Stereoselective reduction of β -keto esters by *Geotrichum candidum* // *Enzyme and Microbial Technology*.— 1992.— V.14.— Pp.731-738.
8. Medson C., Smallridge A.J., Trehwella M.A. The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent // *Tetrahedron: Asymmetry*.— 1997.— V.8.— Pp.1049-1054.
9. Чанышева А.Р., Юнусова Г.В., Воробьева Т.Е., Зорин В.В. Энантиоселективный синтез (*S*)-1-фенилэтанола — предшественника низкомолекулярных биорегуляторов // *Экологическая химия*.— 2017.— Т.26, №1.— С.6-10.
10. Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Дельмухаметов Р.Р., Коренева С.В., Зорин В.В. Микробиологическое энантиоселективное восстановление ацетофенона и его функциональных производных // *Баш. хим. ж.*— 2012.— Т.19, №2.— С.71-73.
11. Василов Л.Я., Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Шахмаев Р.Н., Зорин В.В. Поиск подходов к стереоконтролю биокатализаторов процесса восстановления 5-гексен-2-она // *Баш. хим. ж.*— 2010.— Т.17, №5.— С.32-36.
12. Калимуллина Л.Я., Петухова Н.И., Зорин В.В. Восстановление ацетофенона с помощью клеток гриба *Geotrichum sp. 85-1* в биоэмульсиях // *Баш. хим. ж.*— 2008.— Т.15, №1.— С.8-10.
13. Петухова Н.И., Коньшина И.И., Спивак А.Ю., Одинокоев В.Н., Зорин В.В. Новый биокатализатор для получения *S*-(—)-2-[6-бензилокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-ил]этанола — предшественника природных α -токолов // *Прикладная биохимия и микробиология*.— 2017.— Т.82, №2.— С.188-195.
14. Chanysheva A.R., Yunusova G.V., Vorobyova T.E., Zorin V.V. Enantioselective synthesis of (*S*)-1-phenylethanol, a precursor to low-

References

1. Semenov A.A. *Ocherk khimii prirodnnykh soedinenii* [Essay on the chemistry of natural compounds]. Novosibirsk, Nayka Publ., 2000, 664 p.
2. Suan C.L., Sarmidi M.R. [Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R*, *S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, vol.28, no.2-3, pp.111-119.
3. Lappin G.J., Stride J.D., Tampion J. [Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia*]. *Phytochemistry*, 1987, vol.26, pp.995-997.
4. 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.
5. Suga T., Lee Y.S., Hirata T. [The hydroxylation of β -terpineol and its acetate with the cultured cells of *Nicotiana tabacum*]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1983, vol.56, pp.784-787.
6. Pawlowicz P., Siewinski A. [Enantioselective hydrolysis of esters and the oxidation of aromatic-aliphatic alcohols obtained there from by *Spirodela oligorrhiza*]. *Phytochemistry*, 1987, vol.26, pp.1001-1004.
7. Patel R., Namee C.G., Banerjee A., Howell J.M., Robison R.S., Szarka L.J. [Stereoselective reduction of β -keto esters by *Geotrichum candidum*]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, vol.14, pp.731-738.
8. Medson C., Smallridge A.J., Trehwella M.A. [The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, vol.8, pp.1049-1054.
9. Chanysheva A.R., Yunusova G.V., Vorobyova T.E., Zorin V.V. *Enantioselektivnyi sintez (S)-1-feniletanola — predshestvoennika nizkomolekulyarnykh bioregulyatorov* [Enantioselective synthesis of (*S*)-1-phenylethanol, a precursor of low molecular weight bioregulators] *Ekologicheskaya khimiya* [Ecological chemistry], 2017, vol.26, no.1, pp.6-10.
10. Shakirov A.N., Petukhova N.I., Delmukhametov R.R., Koreneva S.V., Zorin V.V. *Mikrobiologicheskoe enantioselektivnoe vosstanovlenie atsetofenona i ego funktsionalnykh proizvodnykh* [Microbiological enantioselective reduction of acetophenone and its functional derivatives] *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2012, vol.19, no.2, pp.71-73.
11. Vasilova L.I., Shakirov A.N., Petukhova N.I., Shakhmaev R.N., Zorin V.V. *Poisk podkhodov k stereokontrollyu biokatalizatorov protsessa vosstanovleniya 5-geksen-2-ona* [Search for approaches to the stereocontrol of biocatalysts of the 5-hexene-2-one reduction process]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2010, vol.17, no.5, pp.32-36.
12. Kalimullina L.Ia., Petukhova N.I., Zorin V.V. *Vosstanovlenie atsetofenona s pomoshchyu kletok griba Geotrichum sp. 85-1 v bioemulsiyakh* [Reduction of acetophenone by means of fungal cells *Geotrichum sp. 85-1* in bioemulsions].

- molecular-weight bioregulators // Russian Journal of General Chemistry.— 2016.— V.86, №13.— Pp.3021-3024.
15. 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.26, №6, Pp.296-300.
 16. Чанышева А. Р., Воробьева Е. Н., Зорин В. В. Энантиоселективное биовосстановление ацетона в (*R*)- и (*S*)-1-фенилэтанолы // Экологическая химия.— 2017.— Т.26, №6.— С.296-300.
 17. Агрономов А. Е., Шабаров Ю.С. Лабораторные работы в органическом практикуме.— М.: Химия, 1974.— 376 с.
 13. Petukhova N.I., Konshina I.I., Spivak A.I., Odinkov V.N., Zorin V.V. *Novyi biokatalizator dlya polucheniya S-(–)-2-[6-benziloksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-il]etanola – predshestvennika prirodnykh ?-tokolov* [A new biocatalyst for the preparation of *S*-(–)-2-[6-benzyloxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-yl] ethanol – precursor of natural α -tokols]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2017, vol.82, no.2, pp.188-195.
 14. Chanysheva A.R., Yunusova G.V., Vorobyova T.E., Zorin V.V. [Enantioselective synthesis of (*S*)-1-phenylethanol, a precursor to low-molecular-weight bioregulators]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016, vol.86, no.13, pp.3021-3024.
 15. 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.26, no.6, pp.296-300.
 16. Chanysheva A. R., Vorobyova E. N., Zorin V. V. *Enantioselektivnoe biovosstanovlenie atsetofenona v (*R*)- i (*S*)-1-feniletanoly* [Enantioselective Bio-Reduction of Acetophenone in (*R*)- and (*S*)-1-Phenylethanols] *Ekologicheskaya khimiya* [Ecological Chemistry], 2017, vol.26, no.6, pp.296-300.
 17. Agronomov A. E., Shabarov I.S. *Laboratornye raboty v organicheskom praktikyme* [Laboratory work in organic practice]. Moscow, Khimiya Publ., 1974, 376 p.