

А. Р. Чанышева (к.х.н., доц.), Е. А. Шейко (магистрант), Ю. К. Юсупова (магистрант),
В. В. Зорин (чл.-корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)

СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОЕ БИОВОССТАНОВЛЕНИЕ *n*-МЕТОКСИАЦЕТОФЕНОНА В (*S*)-1-(4-МЕТОКСИФЕНИЛ)ЭТАНОЛ

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

A. R. Chanysheva, E. A. Sheiko, Y. K. Yusupova, V. V. Zorin

STEREOSELECTIVE BIOREDUCTION OF *p*-METHOXYACETOPHENONE INTO (*S*)-1-(4-METHOXYPHENYL)ETHANOL

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

Предложен метод синтеза (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола — важного предшественника, используемого в производстве различных лекарственных препаратов, путем биовосстановления прохирального *p*-метоксиацетофенона в присутствии клеток культуры *D. carota*. Исследована возможность применения различных экзогенных восстановителей таких как этанол, изопропанол и глюкоза с целью повышения выхода целевого (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола и энантиоселективности процесса биовосстановления *p*-метоксиацетофенона.

Ключевые слова: биовосстановление; биокатализатор; вторичные спирты; *n*-метоксиацетофенон; (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанол; (*R*)-1-(4-метоксифенил)этанол; ферменты; энантиоселективный биокатализ.

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).

(*S*)-1-(4-метоксифенил)этанол является предшественником в синтезе циклоалкил[b]-индолов, применяемых при лечении аллергических заболеваний, а также используется в синтезе интермедиатов фармацевтических препаратов, снижающих уровень холестерина и липопротеинов в плазме крови (аторвастатин).

The method for the synthesis of (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol, an important precursor used in the production of various drugs, by bioreduction of prochiral *p*-methoxyacetophenone in the presence of *D. carota* culture cells is offered. The possibility of using of various exogenous reducing agents such as isopropanol, ethanol and glucose to increase the yield of the desired (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol and the enantioselectivity of the *p*-methoxyacetophenone bioreduction process has been investigated.

Key words: bioreduction; biocatalyst; *p*-methoxyacetophenone; (*R*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol; (*S*)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol; enzymes; enantioselective biocatalysis; secondary alcohols.

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

В свою очередь, (*R*)-1-(4-метоксифенил)этанол может быть использован в синтезе оптически активных 3-арил-3-замещенных пропановых кислот, обладающих противовоспалительной активностью¹⁻³.

Известно, что восстановление *n*-метоксиацетофенона приводит к образованию (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола в присутствии различных биокатализаторов с умеренными выходами и оптической чистотой⁴⁻⁶.

Дата поступления 21.02.19

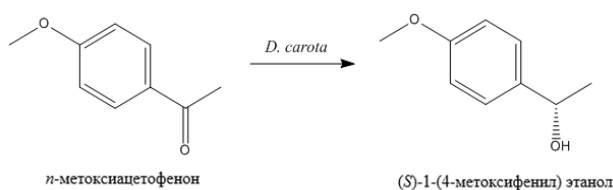
В последние годы многими авторами работ по энантиоселективному восстановлению прохиральных кетонов отдается предпочтение биокатализаторам на основе клеток растений, поскольку выделение продукта из раствора с этой биомассой менее затруднительно, чем из раствора, содержащего микробную биомассу. Кроме того, биокатализаторы на основе клеток растений легкодоступны ^{7–13}.

Ранее нами было показано, что использование таких экзогенных восстановителей, как этанол, изопропанол, глюкоза позволяет повысить выход целевых спиртов и их оптическую чистоту.

Хотя кинетика накопления продуктов восстановления прохиральных кетонов существенно зависит от активности биокатализатора даже одной и той же природы, присутствие экзогенных восстановителей способствует увеличению выхода целевого продукта.

Нами была изучена возможность оптимизации условий синтеза оптически чистого (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола из соответствующего *n*-метоксиацетофенона с участием биокатализатора на основе клеток *Daucus carota* (морковь дикая) в присутствии экзогенных восстановителей – кофермента NAD⁺ (этанол, изопропанол и глюкоза) при различных концентрациях.

Восстановление *n*-метоксиацетофенона с участием биокатализатора *D. carota* в воде при комнатной температуре в течение 144 ч приводит к образованию (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола с низким выходом 3.7% и невысокой оптической чистотой 49% *ee*.



Биотрансформация *n*-метоксиацетофенона в присутствии этанола (0–5%), приводит к образованию (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола также с низкими выходами 1.2–3.8%, но несколько более высокой оптической чистотой 28–85% *ee* (табл. 1). В присутствии изопропанола (0–5%) удается повысить как выход целевого продукта 3.7–19%, так и оптическую чистоту 49–80% *ee* (табл. 2).

Установлено, что при добавлении в реакционную смесь 3% изопропанола выход и оптическая чистота (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола повышается до 19 и 55% *ee* по сравнению

с биовосстановлением в отсутствие экзогенного восстановителя. Добавление 1% изопропанола приводит к снижению выхода продукта (11%), при этом оптическая чистота возрастает до 80% *ee*.

При увеличении содержания этанола и изопропанола в реакционной смеси выход целевого (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола существенно снижается, что, вероятно, вызвано ингибированием оксидоредуктазы.

Таблица 1
Зависимость выхода и энантиомерной чистоты (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола от концентрации этанола при биовосстановлении *n*-метоксиацетофенона

Концентрация этанола, %	0	1	2	3	4	5
Выход, %	3.7	3.3	3.8	2.2	2.4	1.2
Оптическая чистота (<i>ee</i>), %	49	52	28	80	85	76

T=25–27 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

Таблица 2
Зависимость выхода и энантиомерной чистоты (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола от концентрации изопропанола при биовосстановлении *n*-метоксиацетофенона

Концентрация изопропанола, %	0	1	2	3	4	5
Выход, %	3.7	11	14	19	12	9
Оптическая чистота (<i>ee</i>), %	49	80	55	55	61	50

T=25–27 °C, растворитель – вода, концентрация субстрата 1.4 г/л

При восстановлении *n*-метоксиацетофенона в воде при комнатной температуре в течение 144 ч в присутствии эквимолярного количества глюкозы образуется (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанол с выходом 7.3% и оптической чистотой 42% *ee*.

За ходом протекания реакций следили хроматографически, используя заведомо синтезированные образцы рацемического 1-(4-метоксифенил)этанола с применением энантиоселективной колонки AstecCHIRALDXTM В-PM, на которой время удерживания (*R*)-1-(4-метоксифенил)этанола меньше, чем (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола.

Строение (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола подтверждали с помощью методов ЯМР ¹H и ¹³C-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Конфигурация (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола была установлена поляриметрически.

Таким образом, в изученных условиях удается осуществить энантиоселективное вос-

становление *n*-метоксиацетофенона в (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанол в присутствии доступного биокатализатора на основе *D. carota* и изо-пропанола в концентрациях 1 и 3 % с выходами 11 и 19 % и оптической чистотой 80 и 55 % *ee*, соответственно.

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 для ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C – ТМС. Спектры ЯМР ^{13}C 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 AstecCHIRALDEXTMB-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) в хлороформе.

Получение (*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола.

n-Метоксиацетофенон (0.1 г) добавляли в суспензию клеток *D. carota* (15 г) в 70 мл воды, реакционную смесь помещали в орбитальный шейкер (150 об./мин) и перемешивали при комнатной температуре. По завершению реакции суспензию фильтровали, биомассу промывали три раза водой. Фильтраты экстрагировали диэтиловым эфиром (3×125 мл). Эфирные вытяжки сушили Na_2SO_4 и отгоняли на роторно-пленочном испарителе.

Спектральные характеристики 1-(4-метоксифенил)этанола совпадают с литературными данными ⁴.

Синтез рацемического (*R*),(*S*)-1-(4-метоксифенил)этанола осуществляли по известной методике ¹⁴.

Литература

1. Andrade L. H., Utsunomiya R. S., Omori A. T., Porto A. L., Comasseto J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2006. – V.38, №2. – Pp.84-90.
2. Dai Y., Huan B., Zhang H.-S., He Y.-C. Effective Biotransformation of Ethyl 4-Chloro-3-Oxobutanoate into Ethyl (*S*)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by Recombinant *E. coli* CCZU-T15 Whole Cells in [ChCl][Gly]-Water Media // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2016. – V.181, №4. – Pp.1347-1359.
3. Wei P., Liang J., Cheng J., Zong M.-H., Lou W.-Y. Markedly improving asymmetric oxidation of 1-(4-methoxyphenyl)ethanol with *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells by adding deep eutectic solvent in a two-phase system // *Microbial Cell Factories*. – 2016. – V.15, №1. – Pp.1-11.
4. Шакиров А. Н., Дельмухаметов Р. Р., Петухова Н. И., Зорин В. В. Энантиоселективное восстановление *p*-метоксиацетофенона с помощью дрожжей *Pichia Fermentans* 87-9 // *Баш. хим. ж.* – 2015. – Т.22, №1. – С.72-75.
5. Maczka W.K., Mironowicz A. Enantioselective reduction of bromo- and methoxyacetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 2004. – V.15. – Pp.1965-1967.
6. Patil D. Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction //

References

1. Andrade L. H., Utsunomiya R. S., Omori A. T., Porto A. L., Comasseto J. V. [Edible catalysts for clean chemical reactions: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, vol.38, no.2, pp.84-90.
2. Dai Y., Huan B., Zhang H.-S., He Y.-C. [Effective Biotransformation of Ethyl 4-Chloro-3-Oxobutanoate into Ethyl (*S*)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by Recombinant *E. coli* CCZU-T15 Whole Cells in [ChCl][Gly]-Water Media]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, vol.181, no.4, pp.1347-1359.
3. Wei P., Liang J., Cheng J., Zong M.-H., Lou W.-Y. [Markedly improving asymmetric oxidation of 1-(4-methoxyphenyl)ethanol with *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells by adding deep eutectic solvent in a two-phase system]. *Microbial Cell Factories*, 2016, vol.15, no.1, pp.1-11.
4. Shakirov A.N., Del'muhametov R.R., Petuhova N.I., Zorin V.V. Enantioselectivnoe vosstanovlenie *p*-metoksiacetofenona s pomoschyu drozhzhei *Pichia Fermentans* 87-9 [Enantioselective reduction of *p*-methoxyacetophenone by yeast *Pichia fermentans* 87-9]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2015, vol.22, no. 1, pp.72-75.
5. Maczka W.K., Mironowicz A. [Enantioselective reduction of bromo-and methoxyacetophenone

- International Journal of ChemTech Research.— 2015.— V.8, №8.— Pp.318-324.
7. 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, №6.— С.6-10.
 8. 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.
 9. Suga T., Hirata T., Lee Y.S. The enantioselective biotransformation of α -terpineol and its acetate with the cultured cells of *Nicotiana tabacum* // Chem. Lett.— 1982.— Pp.1595-1598.
 10. Чанышева А. Р., Воробьева Т. Е., Шейко Е. А., Зорин В. В. Энантиоселективное восстановление ацетофенона лиофилизированными клетками *D. Carota* // Баш. хим. ж.— 2018.— Т.25, №2.— С.41-45.
 11. Чанышева А.Р., Воробьева Е.Н., Зорин В.В. Энантиоселективное биовосстановление ацетофенона в (*R*)-и (*S*)-1-фенилэтанола // Экологическая химия.— 2017.— Т.26, №6.— С.296-300.
 12. Чанышева А.Р., Шейко Е.А., Зорин В.В. Стереоселективное биовосстановление гексан-2-она в (*2S*)-(+)-гексан-2-ол // Экологическая химия.— 2018.— Т.27, №4.— С.229-232.
 13. Шейко Е. А., Медникова Е. Э., Воробьева Т. Е., Чанышева А. Р. // Исследование условий энантиоселективного биовосстановления ацетофенона в (*S*)-(-)-1-фенилэтанол / Баш. хим. ж.— 2018.— Т.25, № 1.— С.55-58.
 14. Агрономов А.Е., Шабаров Ю.С. Лабораторные работы в органическом практикуме.— М.: Химия.— 1974.— С.376.
 6. Patil D. [Biocatalysis using plant material: A green access to asymmetric reduction]. *International Journal of ChemTech Research*, 2015, vol.8, no.8, pp.318-324.
 7. 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. doi: 10.1134/S107036321613017X.
 8. 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.
 9. Suga T., Hirata T., Lee Y.S. [The enantioselective biotransformation of α -terpineol and its acetate with the cultured cells of *Nicotiana tabacum*]. *Chem. Lett.*, 1982, pp. 1595-1598.
 10. Chanysheva A. R., Vorobyeva T. E., Sheiko E. A., Zorin V. V. *Enantioselektivnoe vosstanovlenie acetofenona liofilizirovannymi kletkami D. Carota* [Enantioselective Reduction of Acetophenone by Lyophilized *D. Carota* Cells]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2018, vol.25, no. 2, pp.41-45.
 11. 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. doi: 10.1134/S1070363217130229.
 12. Chanysheva A.R.; Sheiko E.A.; Zorin V.V [Stereoselective bioreduction of hexan-2-one into (*2S*)-(+)-hexan-2-ol]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2018, vol.88, no.13, pp. 2934-2936. doi: 10.1134/S1070363218130170.
 13. Sheiko E. A., Mednikova E. Je., Vorobyeva T. E., Chanysheva A. R. *Issledovanie uslovii enantioselektivnogo biovosstanovleniya acetofenona v (*S*)-(-)-1-feniljetanol* [Investigation of enantioselective bioreduction conditions of acetophenone to (*S*)-(-)-1-phenylethanol]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2018, vol.25, no.1, pp.55-58.
 14. Агрономов А.Е., Шабаров Ю.С. *Laboratornye raboty v organicheskom praktikume* [Laboratory Manual in Organic Chemistry], Moscow: Khimiya Publ., 1974, p.376.