

А. В. Митягина (асп.), Н. И. Петухова (к.б.н., доц.), Ф. А. Прищепов (к.т.н., доц.),
В. В. Зорин (чл.-корр. АН РБ, д.х.н., проф., зав. каф.)

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ 5-ГЕКСЕН-2-ОНА В *S*-5-ГЕКСЕН-2-ОЛ С ПОМОЩЬЮ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ В ПРИСУТСТВИИ ИЗОПРОПАНОЛА

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

A. V. Mityagina, N. I. Petukhova, F. A. Prishchepov, V. V. Zorin

ENANTIOSELECTIVE REDUCTION OF 5-HEXEN-2-ONE TO (*S*)-5-HEXEN-2-OL BY METHYLOTROPHIC YEASTS IN PRESENCE OF ISOPROPANOL

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

Найден новый цельноклеточный биокатализатор, перспективный для разработки методов энантиоселективного восстановления карбонилсодержащих соединений в энантиомерно чистые вторичные спирты. Установлено, что биокатализатор проявляет высокую активность и энантиоселективность в присутствии изопропанола как экзогенного восстановителя. Показано, что биовосстановление 5-гексен-2-она протекает с образованием *S*-5-гексен-2-ола высокой чистоты (не менее 99% *ee*). Подобраны условия, в которых 5-гексен-2-он в концентрации 15 г/л восстанавливается в *S*-5-гексен-2-ол с выходом 89%.

Ключевые слова: биовосстановление кетонов; 5-гексен-2-он; (*S*)-5-гексен-2-ол; дрожжи; энантиоселективный биокатализ.

Важнейшими промежуточными соединениями в синтезе многих современных лекарственных веществ и экологически безопасных инсектицидов являются энантиомерно чистые вторичные спирты^{1–8}. В частности, *S*-5-гексен-2-ол является предшественником (2*S*,7*S*)-дибутироксинонана — полового феромона оранжевой злаковой галлицы (*Sitodiplosis mosellana*)⁷ и (–)-спонгодипсина — противоопухолевого препарата, проявляющего высокую цитотоксическую и антипролиферативную активность⁸.

Перспективным подходом для получения энантиомерно чистых вторичных спиртов яв-

A new promising cell biocatalyst for the enantioselective synthesis of enantiomerically pure secondary alcohols by carbonyl reduction was found. It was detected that the biocatalyst is specific to isopropanol as co-substrate. It is shown that 5-hexen-2-one is reduced to optically pure (*S*)-5-hexen-2-ol (>99% *ee*). The optimal conditions under which the conversion of 5-hexen-2-one in concentration of 15 g/L to (*S*)-5-hexen-2-ol is performed with the yield of 89% were established.

Key words: bioreduction of ketones; enantioselective biocatalysis; 5-hexen-2-one; *S*-5-hexen-2-ol; yeast.

ляется биокаталитическое восстановление prochirальных кетонов с помощью целых клеток микроорганизмов в присутствии экзогенного восстановителя^{1–3, 9–12}. Наиболее часто в качестве биокатализаторов в таких процессах используются дрожжи, обладающие, как известно, высокой карбонилредуктазной активностью¹³.

Ранее было показано, что ряд дрожжевых культур могут восстанавливать 5-гексен-2-он в отсутствие экзогенного восстановителя с высокой конверсией, но низкой энантиоселективностью¹⁴. Внесение в реакционную смесь изопропанола увеличивает селективность этого процесса¹⁵. Предложен метод получения энантиомерно чистого *S*-5-гексен-2-ола (не менее 99% *ee*) с вы-

Дата поступления 13.07.21

ходом 88% восстановлением 5-гексен-2-она (5 г/л) в присутствии 5% изопропанола и дрожжей *Pichia fermentans* 87-9. Однако существенным недостатком этого метода является потребность в высокой концентрации дрожжевой биомассы (80 г/л абсолютно сухой биомассы) ¹⁶.

С целью разработки более эффективного метода получения *S*-5-гексен-2-ола в данной работе осуществлен поиск новой дрожжевой культуры, способной осуществлять энантиоселективное восстановление 5-гексен-2-она в присутствии изопропанола при более низкой концентрации биомассы, а также подбор оптимальных условий трансформации для наиболее перспективного биокатализатора.

Поиск перспективной культуры осуществляли среди 39 изолятов дрожжей, выделенных из почвы, сточных вод нефтехимических предприятий, поверхности растений.

Восстановление 5-гексен-2-она осуществляли с помощью трехсуточной биомассы дрожжей в течение 4 ч при температуре 30 °С в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 5 г/л субстрата и 5% изопропанола. Биомассу дрожжей вносили в реакционную смесь в концентрации 40 г/л (асб).

В результате тестирования дрожжей в указанных условиях были выявлены 23 культуры, восстанавливающие субстрат с конверсией более 10% (рис. 1). Исследование продуктов трансформации методом энантиоселективной ГЖХ показало, что все тестируемые микроорганизмы катализируют процесс с преимущественным образованием *S*-5-гексен-2-ола. Энантиомерный избыток полученных продуктов варьировал от 19 до 99.3 % в зависимости от культуры.

Энантиомерно чистый продукт (не менее 99% *ee*) с выходом более 60% был получен при помощи 5 дрожжевых культур (рис. 1). Наиболее активно осуществлял восстановление 5-гексен-2-она изолят ДГР-3, близкий по своим морфологическим, культуральным и биохимическим характеристикам к метилотрофным дрожжам рода *Ogataea* ¹⁷. В его присутствии выход *S*-5-гексен-2-ола достигал 88% при энантиомерной чистоте 99.3% *ee*.

По этим показателям культура ДГР-3 сопоставима с эффективностью дрожжей *Pichia fermentans* 87-9 ¹⁶, но при этом требуется в 2 раза меньший расход биомассы.

Таким образом, найден новый перспективный клеточный биокатализатор (клетки метилотрофных дрожжей ДГР-3) для энантиоселективного восстановления 5-гексен-2-она в *S*-5-гексен-2-ол.

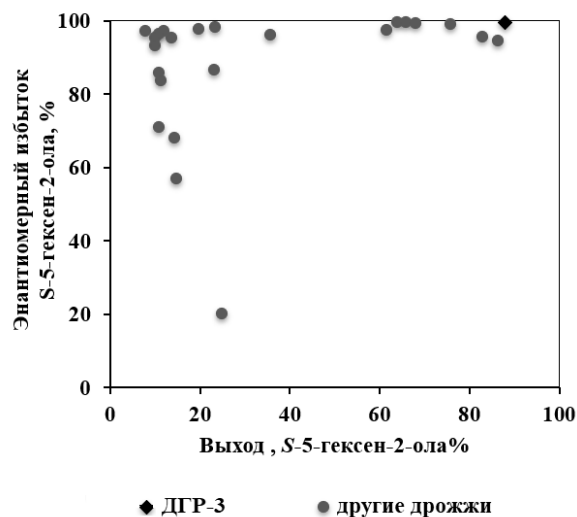


Рис. 1. Выход и энантиомерная чистота *S*-5-гексен-2-ола при восстановлении 5-гексен-2-она (5 г/л) в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 5% изопропанола и 40 г/л биомассы дрожжей, при температуре 30 °С в течение 4 ч

При поиске оптимального экзогенного восстановителя для восстановления 5-гексен-2-она с помощью найденного биокатализатора было установлено, что замена изопропанола на такие известные альтернативные доноры атомов водорода, как этанол, бутанол-2, циклогексанол и глюкоза, также используемые в реакциях биовосстановления кетонов ^{18–25}, является не эффективной. В случае использования глюкозы и этанола конверсия субстрата была близка к контролю (без добавления экзогенного восстановителя), а при использовании бутанола-2 и циклогексанола была даже ниже, чем в контрольном варианте (рис. 2).

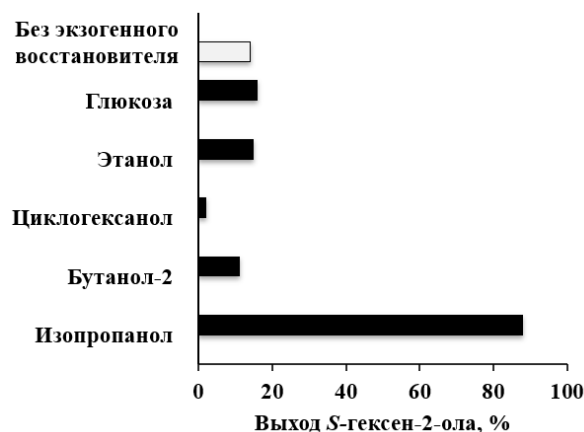
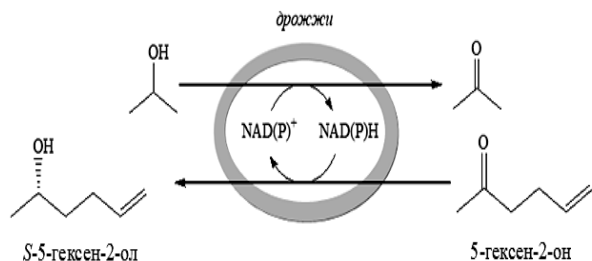


Рис. 2. Выход *S*-5-гексен-2-ола при восстановлении 5-гексен-2-она с помощью дрожжей ДГР-3 в присутствии различных экзогенных восстановителей в течение 4 ч при 30 °С в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 5% изопропанола, 5 г/л субстрата и 40 г/л биомассы

На основании литературных данных ^{23–25} и полученных результатов можно предположить, что в клетках дрожжей ДГР-3 имеется никотинамиддинуклеотид- или никотинамиддениндинуклеотидфосфат-зависимая ферментативная система, катализирующая каскад окислительно-восстановительных реакций с использованием изопропанола в качестве экзогенного восстановителя для регенерации кофермента.



Для подбора оптимальных условий восстановления 5-гексен-2-она с помощью дрожжей ДГР-3 в присутствии изопропанола исследовали зависимость выхода продукта от кислотности среды, температуры, концентрации субстрата и экзогенного восстановителя. Время реакции составляло 4 ч.

В результате исследования было установлено, что наиболее эффективно процесс протекает при pH 7.0 (рис. 3а) и температуре 30–35 °С (рис. 3б).

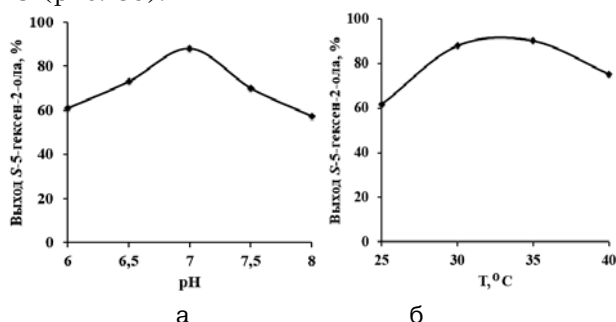


Рис. 3. Зависимость выхода S-5-гексен-2-ола от кислотности среды (а) и температуры (б) при восстановлении 5-гексен-2-она в 0.1 М фосфатном буфере, содержащем 5% изопропанола, 5 г/л субстрата и 40 г/л дрожжей ДГР-3, в течение 4 ч

Оптимальная концентрация изопропанола в реакционной смеси находится в области 5–7.5 % (рис. 4а). Увеличение концентрации экзогенного восстановителя свыше 10% негативно влияет на восстановительные свойства биомассы.

Наибольший выход S-5-гексен-2-ола достигается при начальной концентрации 5-гексен-2-она 5 г/л (рис. 4б). Однако даже при начальной концентрации субстрата 15 г/л выход продукта составляет ~50%.

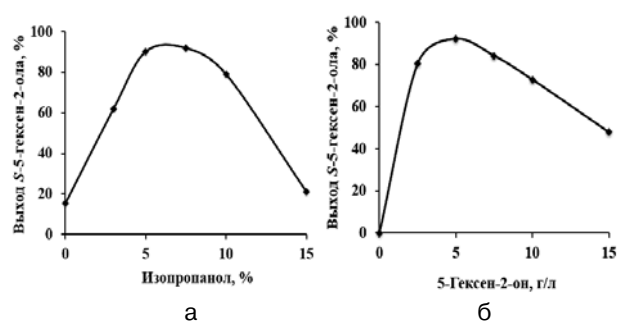


Рис. 4. Зависимость выхода S-5-гексен-2-ола от концентрации изопропанола (а) и субстрата (б) при восстановлении 5-гексен-2-она в течение 4 ч при 35 °С в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 40 г/л биомассы дрожжей ДГР-3

Исследование динамики восстановления 5-гексен-2-она при оптимальной начальной концентрации субстрата (5 г/л) показало, что в течение 4 ч выход продукта достигает своего максимального значения — 92% (рис. 5). При этом S-5-гексен-2-ол образуется с энантиомерным избытком не менее 99%.

Увеличение продолжительности реакции до 12 ч позволяет также достичь высокого выхода (89%) энантиомерно чистого S-5-гексен-2-ола (не менее 99% ee) при более высокой начальной концентрации субстрата — 15 г/л (рис. 5).

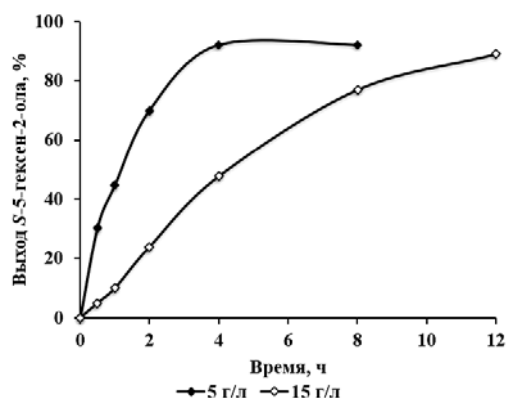


Рис. 5. Динамика выхода S-5-гексен-2-ола при восстановлении 5-гексен-2-она в при 35 °С в 0.1 М буфере, содержащем 7.5% изопропанола и 40 г/л биомассы дрожжей ДГР-3, при начальной концентрации субстрата 5 и 15 г/л

Таким образом, полученные результаты показывают, что с помощью нового клеточного биокатализатора на основе метилотрофных дрожжей ДГР-3 может быть реализован более эффективный метод получения S-5-гексен-2-ола (не менее 99% ee) по сравнению с описанным ранее штаммом *Pichia fermentans* 87-9 ¹⁶. Преимущество связано как с более низким расходом биомассы, так и возможностью работать

при более высокой концентрации субстрата. Последнее преимущество особенно важно, поскольку значительные расходы приходится на стадию выделения целевого продукта.

Учитывая широкую субстратную специфичность дрожжевых карбонилредуктаз ^{9, 26, 27}, можно полагать, что найденный биокатализатор будет полезным для разработки методов энантиоселективного восстановления ряда других практически важных карбонилсодержащих соединений, с использованием в качестве экзогенного восстановителя доступного изопропанола.

Экспериментальная часть

Биомассу микроорганизмов для трансформации выращивали в течение трех суток при температуре 30 °С на среде, содержащей 1% глюкозы, 0.5% дрожжевого экстракта, 1.5% агара, 0.05% NaCl, 0.04% MgSO₄, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KН₂РO₄ и 0.01% K₂НРO₄.

Тестирование дрожжевых культур на способность восстанавливать 5-гексен-2-он осуществляли при 30 °С в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем изопропанол (5%), биомассу микроорганизмов (40 г/л асб) и субстрат (5 г/л), при перемешивании в течение 4 ч.

При поиске оптимальных исследований условий восстановления 5-гексен-2-она в *S*-5-гексен-2-ол с помощью дрожжей ДГР-3 (40 г/л асб) варьировали значения кислотности среды (рН от 6.0 до 8.0); температуры (от 25 до 40 °С); концентрации 5-гексен-2-она (от 0 до 15 г/л) и изопропанола (от 0 до 15 %).

В экспериментах по поиску оптимального экзогенного восстановителя вместо изопропанола в реакционную смесь вносили глюкозу (2%), этанол (5%), бутанол-2 (5%) или циклогексанол (5%). В качестве контроля использовали вариант без добавления экзогенного восстановителя.

Для текущего контроля реакции отбирали пробы реакционной смеси. Полученные пробы центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин, дважды экстрагировали этилацетатом, экстракт осушали безводным MgSO₄. Текущий контроль концентрации субстрата и продукта

в пробах осуществляли на хроматографе «Хроматек Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором на хиральной капиллярной колонке Supelco BetaDEX 110 (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Режим анализа: температура испарителя 220 °С, температура детектора 220 °С, температура колонки 60–220 °С, скорость нагрева 5 °С/мин, давление газа-носителя 100 кПа, расход водорода 25 мл/мин, расход воздуха 250 мл/мин, газ-носитель – гелий).

В качестве стандартного образца продукта трансформации использовали рацемическую смесь 5-гексен-2-ола, полученную встречным синтезом путем восстановления 5-гексен-2-она борогидридом натрия.

Выделение *S*-5-гексен-2-ола производили из осветленной центрифугированием реакционной смеси (15 мин при 9000 об/мин). Продукт трансформации высаливали NaCl и трехкратно экстрагировали равным объемом диэтилового эфира. Экстракт осушали над обезвоженным сульфатом натрия, концентрировали на ротаторно-пленочном испарителе и фракционировали на хроматографической колонке с силикагелем Merk 60 (0.063–0.200 мм), элюент – гексан:этилацетат (8:1).

Конфигурацию *S*-5-гексен-2-ола определяли поляриметрически на поляриметре Perkin Elmer-141-МС. Стандартная величина удельного вращения *S*-(+)-5-гексен-2-ола – $[\alpha]_D^{25} + 15$ ($c = 1.0\%$, CHCl₃), *R*-(-)-5-гексен-2-ола – $[\alpha]_D^{25} - 15$ ($c = 1.0\%$, CHCl₃) ²⁸.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре «BRUKER AM-300» (рабочая частота 500.13 МГц для ¹H и 126.76 МГц для ¹³C) в растворах CDCl₃. За внутренний стандарт принимали значение сигналов хлороформа: в ЯМР ¹H – примесь протонов в дейтерированном растворителе (δ 7.27 м.д.), в ЯМР ¹³C – средний сигнал CDCl₃ (δ 77.00 м.д.).

Спектр ЯМР ¹H в CDCl₃, δ , м.д.: 1.11 д (3H, CH₃), 1.36-1.55 м (2H, CH₂), 1.96-2.16 м (2H, CH₂CH=), 2.91 уш. с (1H, OH), 3.66-3.76 м (1H, CHOH), 4.86-4.99 м (2H, CH₂=), 5.68-5.82 м (1H, CH=). Спектр ЯМР ¹³C в CDCl₃, δ , м.д.: 23.07 (1C, CH₃), 29.88 (1C, CH₂), 38.00 (1C, CH₂), 67.06 (1C, CHOH), 114.32 (1C, CH₂=), 138.33 (1C, CH=).

Литература

1. Patel R. N. Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis // *Coord. Chem. Rev.* – 2008. – V.252, №5-7. – Pp.659-701.
2. Pollard D. J., Woodley J. M. Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future Is Now // *Trends Biotechnol.* – 2007. – V.25, №2. – Pp. 66-73.

References

1. Patel R. N. [Synthesis of Chiral Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis]. *Coord. Chem. Rev.*, 2008, vol.52, no.5-7, pp.659-701.
2. Pollard D. J., Woodley J. M. [Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future Is Now]. *Trends Biotechnol.*, 2007, vol.25, no.2, pp. 66-73.

3. Huisman G. W., Liang J., Krebber A. Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases // *Current Opinion in Chemical Biology*.— 2010.— V.14, №2.— Pp.122-129.
4. Kharisov R.Ya., Ishmuratova N.M., Ishmuratov G.Yu., Tolstikov G.A., Petukhova N.I., Davletova A.R., Zorin V.V. Insect pheromones and their analogs. LX. Stereocontrolled synthesis of sex pheromones of *Drosophila mulleri* and mayetiola // *Chemistry of Natural Compounds*.— 2000.— V.36, №2.— Pp.210-212.
5. Zorin V. V., Petukhova N. I., Shakhmaev R. N. Promising directions for utilization of glycerol-containing waste from biodiesel fuel production // *Russian Journal of General Chemistry*.— 2012.— V.5, №82.— Pp.1013-1026.
6. Petukhova N. I., Kon'shina I. I., Spivak A. Yu., Odinokov V. N., Zorin V. V. Novel Biocatalyst for Productions of *S*(-)-2-[6-Benzoyloxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-yl] Ethanol — Precursor of Natural α -Tocols // *Applied Biochemistry and Microbiology*.— 2017.— V.53, №2.— Pp.187-193.
7. Hooper A.M., Dufour S., Willaert S.P., Pickett J.A. Synthesis of (2*S*,7*S*)-dibutyroxynonane, the sex pheromone of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae), by diastereoselective silicon-tethered ring-closing metathesis // *Tetrahedron Lett.*—2007.— V.48, №34.— Pp.5991-5994.
8. Grassia A., Bruno I., Debitus C., Marzocco S., Pinto A., Gomez-Paloma L., Riccio R. Spongidepsin, a new cytotoxic macrolide from *Spongia* sp. // *Tetrahedron*.— 2001.— V.57, №29.— Pp.6257-6260.
9. de Carvalho C. C. C. R. Whole Cell Biocatalysts: Essential Workers from Nature to the Industry // *Microb. Biotechnol.*— 2017.— V.10, №2.— Pp.250-263.
10. Goldberg K., Schroer K., Lutz S., Liese A. Biocatalytic ketone reduction — a powerful tool for the production of chiral alcohols — part II: whole-cell reductions // *Applied Microbiology And Biotechnology*.— 2007.— V.76, №1.— Pp.249-255.
11. Yan Ni, Jian-He Xu. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols // *Biotechnology Advances*.— 2012.— V.30, №6.— Pp.1279-1288.
12. Hollmann F., Opperman D. J., Paul C. E. Biocatalytic Reduction Reactions from a Chemists Perspective // *Angew. Chem. Int. Ed.*— 2021.— V.60, №11.— Pp.5644-5665.
13. Nagy-Gyo L., Lacatus M., Balogh-Weiser D., Csuka P., Bodai V., Erdelyi B., Molnar Z., Hornyanszky G., Paizs C., Poppe L. How to Turn Yeast Cells into a Sustainable and Switchable Biocatalyst On-Demand Catalysis of Ketone Bioreduction or Acyloin Condensation // *ACS Sustainable Chem. Eng.*— 2019.— V.7.— Pp.19375-19383.
14. Калимуллина Л.Я., Шакиров А.Н., Шахмаев Р.Н., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг биокатализаторов для энантиоселективного восстановления 5-гексен-2-она // *Баш. хим. ж.*— 2009.— Т.16, №4.— С.74-76.
15. Василова Л. Я., Шакиров А. Н., Шахмаев Р. Н., Петухова Н. И., Зорин В. В. Поиск подхо-
3. Huisman G. W., Liang J., Krebber A. [Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, vol.14, no.2, pp.122-129.
4. Kharisov R.Ya., Ishmuratova N.M., Ishmuratov G.Yu., Tolstikov G.A., Petukhova N.I., Davletova A.R., Zorin V.V. [Insect pheromones and their analogs. LX. Stereocontrolled synthesis of sex pheromones of *Drosophila mulleri* and mayetiola]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2000, vol.36, no.2.— Pp.210-212.
5. Zorin V. V., Petukhova N. I., Shakhmaev R. N. [Promising directions for utilization of glycerol-containing waste from biodiesel fuel production]. *Russian Journal of General Chemistry*, 2012, vol.5, no.82, pp.1013-1026.
6. Petukhova N. I., Kon'shina I. I., Spivak A. Yu., Odinokov V. N., Zorin V. V. [Novel Biocatalyst for Productions of *S*(-)-2-[6-Benzoyloxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-yl] Ethanol — Precursor of Natural α -Tocols]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol.53, no.2, pp.187-193.
7. Hooper A.M., Dufour S., Willaert S.P., Pickett J.A. [Synthesis of (2*S*,7*S*)-dibutyroxynonane, the sex pheromone of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae), by diastereoselective silicon-tethered ring-closing metathesis]. *Tetrahedron Lett.*, 2007, vol.48, no.34, pp.5991-5994.
8. Grassia A., Bruno I., Debitus C., Marzocco S., Pinto A., Gomez-Paloma L., Riccio R. [Spongidepsin, a new cytotoxic macrolide from *Spongia* sp.]. *Tetrahedron*, 2001, vol.57, no.29, pp.6257-6260.
9. de Carvalho C.C.C.R. [Whole Cell Biocatalysts: Essential Workers from Nature to the Industry]. *Microb. Biotechnol.*, 2017, vol.10, no.2, pp.250-263.
10. Goldberg K., Schroer K., Lutz S., Liese A. [Biocatalytic ketone reduction — a powerful tool for the production of chiral alcohols — part II: whole-cell reductions]. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2007, vol.76, no.1, pp.249-255.
11. Yan Ni, Jian-He Xu [Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols]. *Biotechnology Advances*, 2012, vol.30, no.6, pp.1279-1288.
12. Hollmann F., Opperman D. J., Paul C. E. [Biocatalytic Reduction Reactions from a Chemists Perspective]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, vol.60, no.11, pp.5644-5665.
13. Nagy-Gyo L., Lacatus M., Balogh-Weiser D., Csuka P., Bodai V., Erdelyi B., Molnar Z., Hornyanszky G., Paizs C., Poppe L. [How to Turn Yeast Cells into a Sustainable and Switchable Biocatalyst On-Demand Catalysis of Ketone Bioreduction or Acyloin Condensation]. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2019, vol.7, pp.19375-19383.
14. Kalimullina L. Ia., Shakirov A. N., Shakhmaev R. N., Petukhova N. I., Zorin V. V. *Skrining biokatalizatorov dlia enantioselektivnogo vosstanovleniia 5-geksen-2-ona* [Screening of biocatalyst for enantioselective reduction of 5-hexen-2-on]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2009, vol.16, no.4, pp.74-76.
15. Vasilova L. Ia., Shakirov A. N., Shakhmaev R. N., Petukhova N. I., Zorin V. V. *Poisk podkhodov k stereokontroliu biokatalizatorov protsessa vosstanovleniia 5-geksen-2-ona* [Approaches to stereo-

- дов к стереоконтролю биокатализаторов процесса восстановления 5-гексен-2-она // Баш. хим. ж. — 2010. — Т.17, №5. — С.32-36.
16. Шакиров А. Н., Дельмухаметов Р. Р., Шахмаев Р. Н., Петухова Н. И., Зорин В. В. Глицерин — сырье для получения биокатализатора энантиоселективного восстановления 5-гексен-2-она в (S)-5-гексен-2-ол — ключевой синтон низкомолекулярных биорегуляторов // Экологическая химия. — 2012. — Т.21, №3. — С.187-192.
 17. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. The Yeasts. — Elsevier Science, 2011. — 2354 p.
 18. Tassano E., Hall M. Enzymatic self-sufficient hydride transfer processes // Chem. Soc. Rev. — 2019. — V.48. — P.5596.
 19. Ni Y., Li Ch.-X., Wang L.-J., Zhang J., Xu J.-H. Highly stereoselective reduction of prochiral ketones by a bacterial reductase coupled with cofactor regeneration // Org. Biomol. Chem. — 2011. — V.9, №15. — Pp.5463-5468.
 20. Yan Z., Nie Y., Xu Y., Liu X., Xiao R. Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration // Tetrahedron Letters. — 2011. — V.52, №9. — Pp. 999-1002.
 21. Broussy S., Cheloha R. W., Berkowitz D. B. Enantioselective, Ketoreductase-Based Entry into Pharmaceutical Building Blocks: Ethanol as Tunable Nicotinamide Reductant // Org. Lett. — 2009. — V.11, №2. — Pp.305-308.
 22. Honda K., Ono T., Okano K., Miyake R., Dekishima Y., Kawabata H. Expression of engineered carbonyl reductase from *Ogataea minuta* in *Rhodococcus opacus* and its application to whole-cell bioconversion in anhydrous solvents // J. Biosci. Bioeng. — 2019. — V.127, №2. — Pp.145-149.
 23. Dascier D., Kambourakis S., Hua L., Rozzell J. D., Stewart J.D. Influence of cofactor regeneration strategies on preparative-scale, asymmetric carbonyl reductions by engineering *Escherichia coli* // Amer. Chem. Soc. — 2014. — V.1, №18. — Pp.793-800.
 24. Goldberg K., Edegger K., Kroutil W., Liese A. Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells // Biotechnol. Bioeng. — 2006. — V.95, №1. — Pp.192-198.
 25. Schroer K., Tacha E., Lutz S. Process intensification for substrate coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal // Org. Process Res. Dev. — 2007. — V.11, №5. — Pp.836-841.
 26. Шакиров А. Н., Петухова Н. И., Зорин В. В. Энантиоселективное восстановление карбонилсодержащих соединений с помощью дрожжей *Pichia fermentans* 87-9 // Баш. хим. ж. — 2013. — Т.20, №4. — С.59-63.
 27. Goldberg K., Schroer K., Lutz S., Liese A. Biocatalytic ketone reduction — a powerful tool for the production of chiral alcohols — part I: processes with isolated enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V.76, №2. — Pp.237-248.
 28. Каталог продукции фирмы Aldrich [Электронный ресурс]: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/ru>
 16. Shakirov A. N., Del'mukhametov R. R., Shakhmaev R. N., Petukhova N. I., Zorin V. V. *Glitserin — syr'e dlya polucheniya biokatalizatora enantioselektivnogo vosstanovleniya 5-geksen-2-ona v (S)-5-geksen-2-ol — klyuchevoi sinton nizkomolekulyarnykh bioregulyatorov* [Glycerol is the feed to obtain biocatalyst for enantioselective reduction of 5-hexen-2-one to (S)-5-hexen-2-ol] *Ekologicheskaya khimiya* [Environmental chemistry], 2012, vol.21, no.3, pp.187-192.
 17. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. [The Yeasts]. Elsevier Science, 2011, 2354 p.
 18. Tassano E., Hall M. [Enzymatic self-sufficient hydride transfer processes]. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, vol.48, p.5596.
 19. Ni Y., Li Ch.-X., Wang L.-J., Zhang J., Xu J.-H. [Highly stereoselective reduction of prochiral ketones by a bacterial reductase coupled with cofactor regeneration]. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, vol.9, no.15, pp.5463-5468.
 20. Yan Z., Nie Y., Xu Y., Liu X., Xiao R. [Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration]. *Tetrahedron Letters*, 2011, vol.52, no.9, pp.999-1002.
 21. Broussy S., Cheloha R. W., Berkowitz D. B. [Enantioselective, Ketoreductase-Based Entry into Pharmaceutical Building Blocks: Ethanol as Tunable Nicotinamide Reductant]. *Org. Lett.*, 2009, vol.11, no.2, pp.305-308.
 22. Honda K., Ono T., Okano K., Miyake R., Dekishima Y., Kawabata H. [Expression of engineered carbonyl reductase from *Ogataea minuta* in *Rhodococcus opacus* and its application to whole-cell bioconversion in anhydrous solvents]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2019, vol.127, no.2, pp.145-149.
 23. Dascier D., Kambourakis S., Hua L., Rozzell J. D., Stewart J.D. [Influence of cofactor regeneration strategies on preparative-scale, asymmetric carbonyl reductions by engineering *Escherichia coli*]. *Amer. Chem. Soc.*, 2014, vol.1, no.18, pp.793-800.
 24. Goldberg K., Edegger K., Kroutil W., Liese A. [Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, vol.95, no.1, pp.192-198.
 25. Schroer K., Tacha E., Lutz S. [Process intensification for substrate coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal]. *Org. Process Res. Dev.*, 2007, vol.11, no.5, pp.836-841.
 26. Shakirov A. N., Petukhova N. I., Zorin V. V. *Enantioselektivnoe vosstanovlenie karbonilsoderzhashchikh soedinenii s pomoshch'yu drozhdzhei Pichia fermentans 87-9* [Enantioselective reduction of carbonyl compounds by yeasts *Pichia fermentans* 87-9]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2013, vol.20, no.4, pp.59-63.
 27. Goldberg K., Schroer K., Lutz S., Liese A. [Biocatalytic ketone reduction — a powerful tool for the production of chiral alcohols — part I: processes with isolated enzymes]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol.76, no.2, pp. 237-248.
 28. *Katalog na produktiiu firmy Aldrich* [Aldrich product catalog]. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/ru>