

ГЛИЦЕРИН – СЫРЬЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРА ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ 5-ГЕКСЕН-2-ОНА В (S)-5-ГЕКСЕН-2-ОЛ – КЛЮЧЕВОЙ СИНТОН НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

А. Н. Шакиров, Р. Р. Дельмухаметов, Н. И. Петухова, Р. Н. Шахмаев, В. В. Зорин

Уфимский государственный нефтяной технический университет, ул. Космонавтов 1, Уфа, 450062 Россия
тел: (347)243-19-35
e-mail: biocatnp@yandex.ru

Поступило в редакцию 11 октября 2012 г.

Показана возможность использования глицерина – побочного продукта (отхода) производства биодизеля для получения энзиматически активной биомассы дрожжей *Pichia sp.* 87-9.

Предложен метод получения (S)-5-гексен-2-ола – ключевого синтона противоопухолевого препарата (–)-спонгодипсина, проявляющего высокую цитотоксическую и антипролиферативную активность в отношении раковых клеточных линий J774.A1, НЕК-293 и WENI-164, а также (2S,7S)-дибутироксинонана – полового феромона оранжевой злаковой галлицы (*Sitodiplosis mosellana*) энантиоселективным биовосстановлением прохирального 5-гексен-2-она с помощью этого клеточного катализатора.

Ключевые слова: биовосстановление, 5-гексен-2-он, 5-гексен-2-ол, микроорганизмы, энантиоселективный биокатализ, глицерин.

В настоящее время в развитых странах Европы и в Америке поиск решения глобальных проблем (энергетической, сырьевой, экологической и др.) осуществляется в области использования альтернативных возобновляемых источников энергии и сырья и, прежде всего, растительной биомассы [1]. В качестве альтернативного биотоплива уже сейчас широко используется биодизель. При производстве биодизельного топлива путем переэтерификации растительных масел низшими спиртами в качестве побочного продукта образуется глицерин. Только в США и Европе ежегодно образуется около 1 млн. тонн глицерина [2], и прирост производства имеет положительную динамику. В России также появилась заинтересованность в создании производства биодизеля, что делает актуальным разработку эффективных технологий переработки глицерина в практически важные продукты [3, 4].

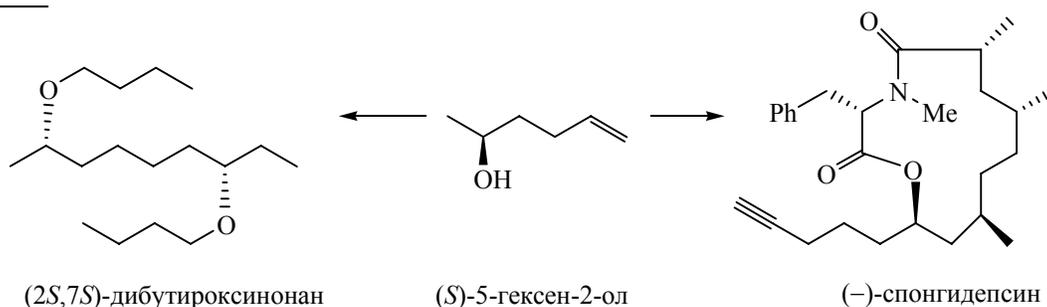
Одним из перспективных направлений утилизации глицеринсодержащих отходов является их

использование в качестве добавок к питательным средам для культивирования микроорганизмов с целью получения ферментных или клеточных биокатализаторов [5]. В этом аспекте особый интерес представляет получение на глицерине энантиоселективных биокатализаторов, использующихся в органическом синтезе эффективных лекарственных веществ – аналогов природных соединений, а также экологически безопасных средств защиты растений – феромонов насекомых [5].

В настоящей статье исследована возможность получения (S)-5-гексен-2-ола – ключевого синтона противоопухолевого препарата (–)-спонгодипсина, проявляющего высокую цитотоксическую и антипролиферативную активность в отношении раковых клеточных линий J774.A1, НЕК-293 и WENI-164 [6], а также (2S,7S)-дибутироксинонана – полового феромона оранжевой злаковой галлицы (*Sitodiplosis mosellana*) [7] энантиоселективным

биовосстановлением прохирального 5-гексен-2-она с помощью энзиматически активной биомассы

дрожжей *Pichia sp.* 87-9, способных расти на пептоно-дрожжевой среде с глицерином (среда ГПД).



Для выявления способности дрожжей осуществлять целевую трансформацию использовали биомассу, полученную поверхностным культивированием на агаризованной пептоно-дрожжевой среде, содержащей 3% глицерина (среда ГПДА). Было обнаружено, что при перемешивании при температуре 30°C в течение 5 ч суспензии клеток дрожжей [80 г(асб)/л] в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7), содержащем 5-гексен-2-он (5 г/л), происходит энантиоселективное восстановление этого прохирального субстрата преимущественно в (*S*)-5-гексен-2-ол с высоким выходом, но низкой оптической чистотой (табл. 1). При увеличении продолжительности реакции до 24 ч достигается

более высокий выход целевого продукта, однако преобладающим в реакционной смеси уже становится *R*-энантиомер 5-гексен-2-ола.

Возможным объяснением обогащения реакционной смеси (*R*)-энантиомером 5-гексен-2-ола может служить стереоинверсия (*S*)-энантиомера 5-гексен-2-ола, образующегося первоначально в качестве основного энантиомера при восстановлении 5-гексен-2-она. В основе такой стереоинверсии может лежать низкая селективность фермента(ов), восстанавливающего 5-гексен-2-он, и низкая активность фермента(ов), окисляющего (*R*)-5-гексен-2-ол.

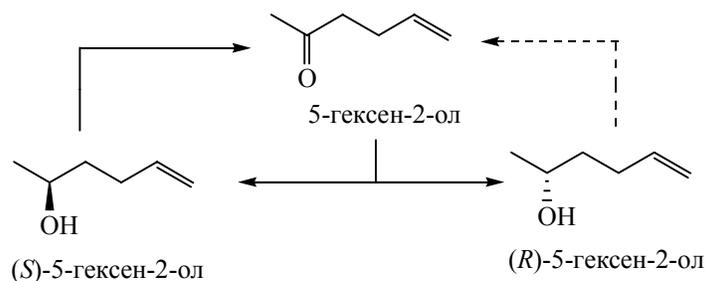


Таблица 1. Выход и энантиомерный состав 5-гексен-2-ола, полученного в процессе восстановления 5-гексен-2-она при 30°C в течение 5 и 24 ч в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7) в присутствии биомассы дрожжей *Pichia sp.* 87-9 [80 г(асб)/л], выращенной на среде ГПДА с 3% глицерина, при концентрации субстрата 5 г/л

Время реакции, ч	Выход продукта, %	Преобладающий энантиомер Продукта	
		Конфигурация	Энантиомерный избыток, %
5	88	<i>S</i>	36.6
24	95	<i>R</i>	3.80

В пользу такого предположения свидетельствуют результаты исследования трансформации рацемического 5-гексен-2-ола с помощью биомассы дрожжей в тех же условиях в течение 24 ч. Было обнаружено, что в ходе реакции происходит окисление спирта в 5-гексен-2-он. Другие продукты в реакционной смеси не обнаруживались. При этом наиболее быстро окислялся (*S*)-энантиомер спирта, что приводило к увеличению энантиомерного избытка (*R*)-энантиомера 5-гексен-2-ола.

Следует отметить, что изменение в ходе реакции энантиомерного состава спиртов, образу-

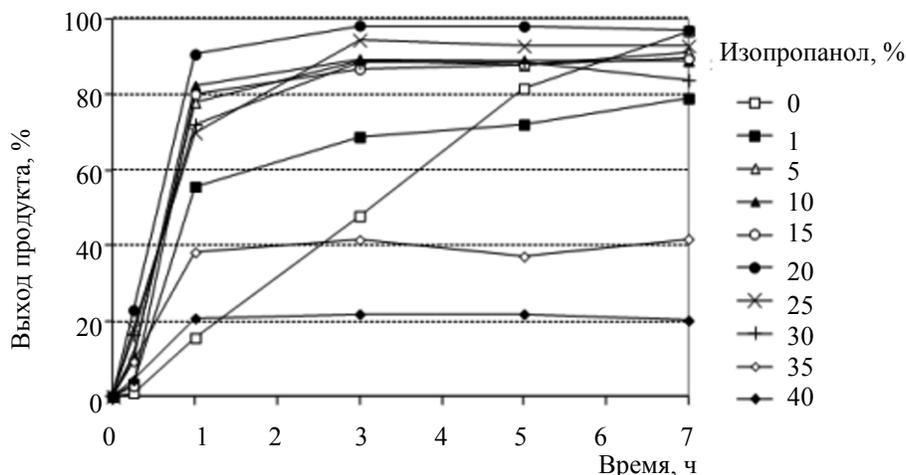


Рис. 1. Влияние концентрации изопропанола в реакционной смеси на выход продукта в процессе восстановления 5-гексен-2-она (5 г/л) в присутствии биомассы дрожжей *Pichia sp.* 87-9 [80 г (асб)/л] при 30°C в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7), полученной на среде ГПДА, содержащей 3% глицерина.

ющихся в процессе восстановления карбонилсодержащих предшественников, происходит часто при использовании клеточных биокатализаторов, поскольку в клетках обычно присутствует несколько оксидоредуктаз, способных восстанавливать субстрат, которые различаются своей энантиоспецифичностью [5, 8–10]. Для получения высокочистых спиртов с помощью клеточных биокатализаторов необходимо подобрать способ подавления активности “мешающих” ферментов [10, 11].

Одним их наиболее простых, но эффективных способов увеличения селективности восстановления карбонилсодержащих соединений в присутствии клеток микроорганизмов является введение в реакционную смесь в высоких концентрациях изопропанола [10, 12]. В связи с этим, с целью увеличения оптической чистоты (*S*)-5-гексен-2-ола, было изучено биовосстановление 5-гексен-2-она дрожжами *Pichia sp.* 87-9 в присутствии 1–40% изопропанола.

При исследовании влияния концентрации изопропанола на скорость образования и выход продукта в ходе трансформации было обнаружено, что начальная скорость реакции существенно увеличивается даже в присутствии низких концентраций изопропанола, который, вероятно, выступает в качестве экзогенного восстановителя при биовосстановлении 5-гексен-2-она (рис. 1). Но наиболее эффективно трансформация протекает в

присутствии 20–25% изопропанола. В этих условиях достигается максимальный выход продукта (94–98%) уже через 3 ч трансформации. Значительное ингибирующее действие изопропанола на исследуемый процесс проявляется только при его концентрации в реакционной смеси более 30%.

Анализ энантиомерного состава 5-гексен-2-ола, образующегося в процессе восстановления 5-гексен-2-она в системах, содержащих 10–30% изопропанола, в течение 3–24 ч показал, что он представляет собой (*S*)-5-гексен-2-ол с оптической чистотой не менее 99%.

Таким образом, энзиматически активная биомасса дрожжей *Pichia sp.* 87-9, полученная на среде ГПДА, содержащей 3% глицерина, является

Таблица 2. Изменение энантиомерного состава 5-гексен-2-ола (5 г/л) в процессе его окисления при 30°C в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7) в присутствии биомассы дрожжей *Pichia sp.* 87-9 [80 г (асб)/л], полученной на среде ГПДА с 3% глицерина

Время реакции, ч	Выход 5-гексен-2-она, %	Превалирующий энантиомер 5-гексен-2-ола	
		Конфигурация	Энантиомерный избыток, %
0	0	–	0
5	5	<i>R</i>	10.1
24	8	<i>R</i>	22

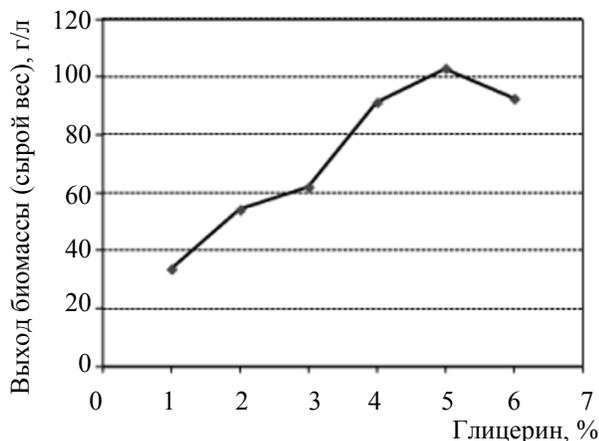


Рис. 2. Зависимость выхода биомассы в процессе культивирования дрожжей *Pichia sp.* 87-9 при 30°C в течение трех суток на среде ГПД от содержания в ней глицерина.

перспективным биокатализатором для получения высокочистого (*S*)-5-гексен-2-ола.

С целью интенсификации процесса восстановления 5-гексен-2-она осуществлен поиск оптимальной концентрации глицерина, обеспечивающий наибольший выход биомассы в процессе глубокого культивирования дрожжей *Pichia sp.* 87-9 в среде ГПД, без снижения ее ферментативной активности.

Было обнаружено, что повышение концентрации глицерина в среде с 3 до 5% приводит почти к двукратному увеличению выхода биомассы (рис. 2). Более высокая концентрация глицерина (6%) несколько снижает выход биомассы по сравнению с максимальной.

При исследовании трансформации 5-гексен-2-она в системе с 20% изопропанола установлено, что

наиболее высокий выход (*S*)-5-гексен-2-ола (93–95%) достигается в течение 3 ч при использовании клеток, полученных на среде ГПД, содержащей 3–4% глицерина (рис. 3). При использовании биомассы, полученной на среде ГПД с оптимальным содержанием глицерина (5%), выход (*S*)-5-гексен-2-ола составляет 88%. Увеличение продолжительности реакции до 6 ч не приводит к существенному увеличению выхода продукта. Обнаружено, что энантиомерная чистота (*S*)-5-гексен-2-ола сохраняется на уровне не менее 99% независимо от состава среды, использованной для выращивания микроорганизмов.

Таким образом, найдено новое направление рационального использования глицерина (побочного продукта производства биодизеля) в качестве компонента питательной среды для получения энзиматически активной биомассы – катализатора энантиоселективного восстановления 5-гексен-2-она в (*S*)-5-гексен-2-ол (ключевой продукт в синтезе экологически безопасного средства защиты растений и противоракового препарата).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записывали в CDCl_3 на приборе Bruker AM-300 (рабочая частота 300 и 75.47 МГц соответственно), внутренний стандарт – остаточный сигнал CHCl_3 или ТМС. Удельное вращение полученных продуктов ($[\alpha]_D^{20}$ продукта) измеряли на автоматическом поляриметре “Perkin Elmer” 341 при $l = 589$ нм, температура 25°C. Стандартная величина удельного вращеня (*S*)-(+)-5-гексен-2-ола – $[\alpha]_D^{25} + 15$ ($c = 1.0\%$, CHCl_3), (*R*)-(–)-5-гексен-2-ола – $[\alpha]_D^{25} - 15$ ($c = 1.0\%$, CHCl_3) [13].

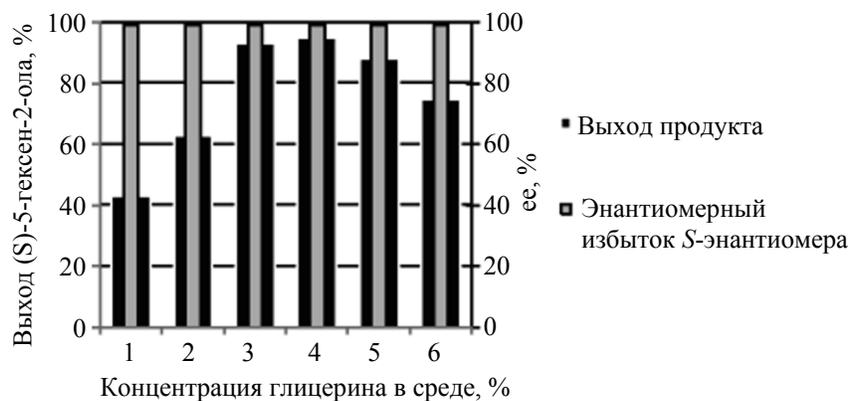


Рис. 3. Выход и энантиомерная чистота (*S*)-5-гексен-2-ола, образующегося в процессе восстановления 5-гексен-2-она (5 г/л) при 30°C в течение 3 ч в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем 20% изопропанола, в присутствии клеток дрожжей *Pichia sp.* 87-9 [80 г (асб)/л], полученных на среде ГПД с различным содержанием глицерина.

В качестве биокатализатора использовали клетки дрожжей *Pichia sp.* 87-9 из коллекции культур микроорганизмов кафедры биохимии и технологии микробиологических производств Уфимского государственного нефтяного технического университета. Биомассу дрожжей получали глубинным культивированием на жидкой среде ГПД (глицерин – 10–60 г/л; дрожжевой экстракт – 10 г/л; пептон – 5 г/л) или поверхностным культивированием на агаризованной среде ГПДА (глицерин – 30 или 50 г/л; дрожжевой экстракт – 10 г/л; пептон – 5 г/л; агар-агар – 15 г/л). Питательные среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120°C.

Глубинное культивирование дрожжей осуществляли в конических колбах на 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды ГПД, при температуре 30°C на орбитальной качалке в течение 72 ч. Выращенную биомассу отделяли от среды центрифугированием в течение 15 мин при 10000 об/мин, трижды промывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.0) и использовали для трансформации. Поверхностное культивирование дрожжей осуществляли в чашках Петри на агаризованной среде ГПДА в термостате при температуре 30°C в течение 72 ч. Собранную биомассу перед трансформацией трижды промывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.0).

Трансформацию 5-гексен-2-она осуществляли в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем 80 г (асб)/л биомассы микроорганизмов, 0–40% изопропанола и 5 г/л субстрата, при температуре 30°C, при перемешивании (120 об/мин) в течение 24 ч.

Текущий контроль концентрации субстрата и продукта в пробах, предварительно осветленных центрифугированием (10 мин при 9000 об/мин), осуществляли на хроматографе “Хроматек Кристалл 5000.2” с пламенно-ионизационным детектором и полярной капиллярной колонке SGE SolGel WAX (45 м×0.32 мм×0.5 мкм). Режим анализа: температура испарителя – 280°C, температура детектора – 280°C, температура колонки – 150°C, давление газа-носителя 250 кПа, расход водорода 25 мл/мин, расход воздуха 250 мл/мин, газ-носитель – азот. Анализ энантиомерного состава продуктов восстановления проводили на том же хроматографе с хиральной капиллярной колонкой Supelco BetaDEX 110 (30 м×0.25 мм×0.25 мкм). Режим анализа: температура испарителя – 220°C, температура детектора –

220°C, температура колонки – 40°C, давление газа-носителя 50 кПа, расход водорода 25 мл/мин, расход воздуха 250 мл/мин, газ-носитель – азот.

Выделение 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 и концентрировали на ротаторно-пленочном испарителе. Непрореагировавший субстрат отделяли от целевого продукта на хроматографической колонке с силикагелем Merk 60 (0.063–0.200 мм), элюент – гексан:этилацетат (8:1). Спектр ЯМР ¹H, 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, δ, м. д.: 23.07 (C¹), 29.88 (C⁴), 38.00 (C³), 67.06 (C²), 114.32 (C⁶), 138.33 (C⁵).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дебабов, В.Г., *Биотехнология*, 2008, № 1, с. 3.
2. Плетнев, М.Ю., *Биотехнология*, 2009, № 1, с. 3.
3. Феофилова, Е.П., Сергеева, Я.Э., Ивашкин, А.А., *Прикл. биохим. микробиол.*, 2010, Т. 46, № 4, с. 405.
4. Зорин, В.В., Петухова, Н.И., Шахмаев, Р.Н., *Российский хим. журнал. ЖВХО им. Д.И. Менделеева*, 2011, Т. 55, № 1, с. 77.
5. Калимуллина, Л.Я., Шакиров, А.Н., Шахмаев, Р.Н., Петухова, Н.И., Зорин, В.В., *Баш. хим. журнал*, 2009, Т. 16, № 4, с. 74.
6. Grassia, A., Bruno, I., Debitus, C., Marzocco, S., Pinto, A., Gomez-Paloma, L., Riccio, R., *Tetrahedron*, 2001, vol. 57, p. 6257.
7. Hooper, A.M., Dufour, S., Willaert, S.P., Pickett, J.A., *Tetrahedron Lett.*, 2007, vol. 48, p. 5991.
8. Василова, Л.Я., Шакиров, А.Н., Петухова, Н.И., Зорин, В.В., *Баш. хим. журнал*, 2010, Т. 17, №5, с. 32.
9. Зорин, В.В., Петухова, Н.И., *Панорама современной химии. Успехи органического катализа и химии гетероциклов*, Москва: Химия, 2006, с. 280.
10. Nakamura, K., Matsuda, T., *J. Org. Chem.*, 1998, vol. 63, p. 8957.
11. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Berlin: Springer, 1997, 245 p.
12. Калимуллина, Л.Я., *Автореф. ... канд. техн. наук*, Казань, 2008.
13. *Каталог на продукцию фирмы Aldrich [Электронный ресурс]: <http://sigma-aldrich.com>*.

Glycerol is the Feed to Obtain Biocatalyst for Enantioselective Reduction of 5-Hexen-2-one to (S)-5-Hexen-2-ol

A. N. Shakirov, R. R. Delmukhametov, N. I. Petukhova,
R. N. Shakhmaev, and V. V. Zorin

Ufa State Petroleum Technological University, Kosmonavtov st. 1, Ufa, 450062 Russia
e-mail: biocatnp@yandex.ru

Abstract—The possibility of glycerol – the by-product (waste) of biodiesel production – use for yeasts *Pichia sp.* 87-9 biomass obtaining was shown.

The (S)-5-hexen-2-ol – the key synthon for the anti-cancer medication (–)-spongodipsin showing high cytotoxic and anti-proliferative activity to the cancer cell lines J774.A1, HEK-293 and WEHI-164 and (2S,7S)-dibutyrylhydroxynonane – orange wheat blossom midge's (*Sitodiplosis mosellana*) sex pheromone – obtaining by enantioselective bioreduction of 5-hexen-2-one over the mentioned above cell catalyst method is proposed.

Key words: bioreduction, 5-hexen-2-one, 5-hexen-2-ol, microorganisms, enantioselective biocatalysis, glycerol.