

УДК 577.152.12:579.66

***Rhodococcus erythropolis* A-27 КАК БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ КЕТОНОВ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИЗОПРОПАНОЛА**

© 2025 г. Н. И. Петухова^{1, **}, А. В. Митягина^{1, *}, В. В. Зорин¹

¹Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, 450062 Россия

*e-mail: a_mityagina@mail.ru

**e-mail: biocatNP@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.07.2024 г.

После доработки 03.09.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Показано, что в присутствии клеток пяти штаммов *Rhodococcus erythropolis*, выделенных из различных антропогенно загрязненных экосистем, и экзогенного восстановителя (изопропанола) протекает энантиоселективное восстановление кетонов (ацетофенона и 6-метил-5-гептен-2-она) с образованием соответствующих спиртов *S*-конфигурации с высоким энантиомерным избытком. С помощью наиболее активного штамма *R. erythropolis* A-27 при оптимальной концентрации изопропанола получены продукты (*S*-1-фенилэтанол и *S*-6-метил-5-гептен-2-ол) с энантиомерным избытком не менее 99.9% и выходом 92 и 93% соответственно. Обнаружено, что данный штамм проявляет толерантность к изопропанолу и может эффективно восстанавливать 6-метил-5-гептен-2-он в *S*-6-метил-5-гептен-2-ол в буфере, содержащем 50% изопропанола.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis*, энантиоселективный биокатализ, биовосстановление кетонов, *S*-6-метил-5-гептен-2-ол, *S*-1-фенилэтанол

DOI: 10.31857/S0555109925010028 **EDN:** CZEQDB

Энантиоселективное восстановление кетонов с помощью биокатализаторов — перспективный подход для получения энантиомерно чистых вторичных спиртов, используемых в качестве предшественников в синтезе различных биологически активных веществ (лекарственных соединений, средств защиты растений и др.) [1–8].

В литературе представлено много примеров применения энантиоселективных алкогольдегидрогеназ (КФ 1.1.1.х., также называемых кеторедуктазами или карбонилредуктазами), выделенных из клеток различных микроорганизмов, для восстановления кетонов с целью формирования хирального центра заданной пространственной конфигурации в молекуле вторичного спирта [1–8]. Однако имеются проблемы, ограничивающие успешную реализацию таких процессов в промышленных масштабах. Одна из них связана с необходимостью использования в качестве восстановителя НАДН или НАДФН в количествах, сопоставимых с субстратом, что значительно увеличивает стоимость

продукта [1, 2, 4–8]. Другая проблема обусловлена плохой растворимостью гидрофобных субстратов в водных средах, что существенно ограничивает скорость реакции [3, 9].

Для снижения затрат в процессах получения энантиомерно чистых вторичных спиртов биовосстановлением кетонов целесообразно использовать в качестве биокатализатора клетки микроорганизмов, содержащие внутриклеточные энантиоселективные дегидрогеназы/карбонилредуктазы, а также ферменты, катализирующие регенерацию НАДН или НАДФН за счет окисления экзогенного восстановителя (глюкозы, изопропанола, формиата и др.) [1, 2, 4–7]. Для увеличения растворимости кетонов в водных растворах могут быть использованы гомогенизаторы — смешиваемые с водой со-растворители (органические и глубокие эвтектические растворители, ионные жидкости) [3, 9].

К наиболее доступным со-растворителям относится изопропанол, который в реакциях восста-

новления кетонов может не только увеличивать растворимость субстрата, но и выполнять роль экзогенного восстановителя [8, 10, 11]. Кроме того, изопропанол может улучшать проницаемость клеток, облегчая транспортировку субстрата и продукта реакции через клеточную мембрану [11].

Для разработки эффективных процессов восстановления кетонов в присутствии изопропанола необходимы клеточные биокатализаторы, которые могут работать при высоких концентрациях этого спирта. Однако многие известные биокатализаторы быстро теряют карбонилредуктазную активность уже в присутствии 20% изопропанола [10, 12]. В связи с этим проводится поиск новых клеточных биокатализаторов, устойчивых к органическим растворителям, включая изопропанол [13–18].

Большой интерес представляют клетки актинобактерий рода *Rhodococcus*, которые отличаются повышенной толерантностью к различным органическим растворителям [14] и широко применяются в синтезе биологически активных веществ благодаря наличию у них различных регио- и энантиоселективных ферментов (дегидрогеназ, монооксигеназ, эпоксидгидролаз, дегалогеназ, нитрилаз, амидаз и др.) [19–22].

На базе штаммов *Rhodococcus opacus* В-4 и *R. rhodochrous* NBRC15564, клеточная поверхность которых характеризуется высокой липофильностью, разработаны биокатализаторы, содержащие энантиоселективные ферменты других микроорганизмов (карбонилредуктазу OCR дрожжей *Ogataea minuta* и термофильные алкогольдегидрогеназы бактерии *Thermus thermophilus* HB27), способные восстанавливать кетоны в чистых полярных растворителях (циклогексаноле, изобутаноле и изопропаноле) [23, 24].

Энантиоселективные дегидрогеназы/карбонилредуктазы найдены в клетках некоторых штаммов родококков (*R. ruber* DSM 44541, *R. erythropolis* WZ010, *R. pyridinivorans*, *R. jostii* TMP1, *R. kyotonensis*) [25–30]. Один из ферментов (АДГ-А из *R. ruber* DSM 44541) проявляет высокую толерантность по отношению к органическим растворителям и может катализировать реакцию в присутствии 50% изопропанола [25, 26].

Следует отметить, что не все штаммы родококков, обладающие высокоселективными дегидрогеназами/редуктазами, пригодны для использования в качестве клеточных катализаторов в процессах энантиоселективного восстановления кетонов. В ряде случаев с помощью таких биокатализаторов получают продукты с низким энантиомерным избытком, как полагают, из-за присутствия в клетках сопутствующих дегидрогеназ с противоположным энантионаправленным каталитическим действием [31]. Энантиоселективное восстановление кетонов в присутствии высоких концентраций изопропанола осуществлено с помощью клеток

R. ruber DSM 44541 — продуцента высокотолерантной алкогольдегидрогеназы [32–34]. В присутствии 22% изопропанола этот клеточный биокатализатор восстанавливает широкий спектр кетонов в спирты S-конфигурации высокой энантиомерной чистоты (более 99%) [32, 33]. Биокатализатор проявляет активность даже при 50%-ной концентрации изопропанола и восстанавливает ряд кетонов (6-метил-5-гептен-2-он, октанон-2) [32, 34]. Ранее было показано [17], что клетки *R. erythropolis* ВКМ Ас-1161 способны энантиоселективно восстанавливать 6-метил-5-гептен-2-он и *n*-хлорацетофенон в буфере, содержащем 20% изопропанола. С помощью клеток этих актинобактерий получены S-6-метил-5-гептен-2-ол (99.9% *ee*) и S-1-(4-хлорфенил)этанол (96.4% *ee*) с выходом 93.8% и 84% соответственно.

Цель настоящей работы — продолжение поиска новых штаммов родококков, перспективных для разработки высокоселективных клеточных биокатализаторов, способных катализировать восстановление кетонов в энантиомерно чистые спирты в присутствии высоких концентраций изопропанола.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали 5 штаммов бактерий (А7-1, А4-72, А15-23, А18-19 и А-27) из коллекции микроорганизмов кафедры биохимии и технологии микробиологических производств Уфимского государственного нефтяного технического университета. Штаммы были выделены из различных антропогенных экосистем Республики Башкортостан (почва и сточные воды предприятий нефтехимии и нефтепереработки) как деструкторы фенола, гексадекана, нефти, эпихлоргидрина или дихлоргидрина глицерина. Все исследуемые штаммы — грамположительные аэробы, некислотоустойчивые, неспорообразующие, неподвижные. Клетки палочковидные, слабо ветвящиеся. Характерен трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки–палочки–кокки). На питательном агаре образуют непрозрачные круглые колонии бледно-розового или оранжевого цвета без воздушного мицелия.

Условия культивирования. Микроорганизмы выращивали при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ на агаризованной питательной среде, следующего состава (г/л): гидролизат рыбной муки — 25, глюкоза — 10, дрожжевой экстракт — 5, агар-агар микробиологический — 15.

Идентификация микроорганизмов. Для определения видовой принадлежности штаммов были проведены амплификация, секвенирование и филогенетический анализ гена 16S рРНК. Геномную ДНК выделяли согласно методике, описанной в работе [35]. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)

TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler ("Bio-Rad Laboratories", США). Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли на секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США) с использованием набора реактивов Big Dye Terminator Cycles equencing Kit v 3.1 ("Applied Biosystems", США), согласно рекомендациям производителя. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рДНК осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v1.0 и MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>). Филогенетическое дерево строили с помощью программы MEGA7 с использованием метода "neighborjoining".

Восстановление кетонов. Для восстановления кетонов использовали биомассу трехсуточной культуры микроорганизмов, собранную с поверхности агаризованной среды. Тестирование способности клеток исследуемых микроорганизмов осуществлять восстановление кетонов проводили при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем 5% изопропанола, 5 г/л субстрата и 200 г/л сырой биомассы. В экспериментах по изучению влияния концентрации изопропанола на восстановление кетонов содержание спирта в буфере варьировали от 0 до 50%.

Анализ субстратов и продуктов восстановления кетонов. Для текущего контроля реакции отбирали пробы реакционной смеси. Полученные пробы центрифугировали при 10000 об./мин в течение 3 мин на центрифуге CM-50 ("ELMI", Латвия), дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенный экстракт осушали безводным сульфатом магния. Концентрацию субстрата и продукта в пробах определяли на хроматографе "Хроматек Кристалл 5000.2" (ЗАО "СКБ Хроматек", Россия) с пламенно-ионизационным детектором на хиральной капиллярной колонке Supelco BetaDEX 110 (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Режим анализа: температура испарителя — 220°C , температура детектора — 220°C , температура колонки — $60\text{--}220^\circ\text{C}$, скорость нагрева — $5^\circ\text{C}/\text{мин}$, давление газа-носителя — 100 кПа, расход водорода — 25 мл/мин, расход воздуха — 250 мл/мин, газ-носитель — гелий.

Для выделения продуктов реакции реакционную массу центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге MPW-351 ("MPW Med. Instruments", Польша). Продукты трансформации высаливали NaCl и троекратно экстрагировали равным объемом диэтилового эфира. Экстракт осушали безводным сульфатом магния, концентрировали на ротационном испарителе RV

10 digital ("IKA", Германия) и фракционировали на хроматографической колонке с силикагелем Merk 60 (0.063–0.2 мм), элюент — гексан:этилацетат (8 : 1).

Конфигурацию продуктов определяли поляриметрически на поляриметре PerkinElmer-141-МС ("PerkinElmer", США). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре "BRUKER AM-300" ("BRUKER BIOSPIN", Германия) в растворах CDCl_3 (рабочая частота 500.13 МГц для ^1H и 126.76 МГц для ^{13}C). За внутренний стандарт принимали значение сигналов хлороформа: в ЯМР ^1H — примесь протонов в дейтерированном растворителе (δ 7.27 м.д.), в ЯМР ^{13}C — средний сигнал CDCl_3 (δ 77.00 м.д.). Спектральные характеристики S-1-фенилэтанола и S-6-метил-5-гептен-2-ола совпадают с литературными данными [36, 37].

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация исследуемых штаммов. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых штаммов показал 100%-ное сходство с *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477^T. Филогенетическое положение штаммов, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, представлено на рис. 1. В соответствии с современной номенклатурой прокариот *R. qingshengii* является более поздним синонимом *R. erythropolis* (<https://lpsn.dsmz.de/species/rhodococcus-qingshengii>), поэтому исследуемые штаммы были отнесены к виду *R. erythropolis*.

Исследование способности микроорганизмов энантиоселективно восстанавливать кетоны в присутствии 5% изопропанола. Для выявления возможности применения клеток исследуемых штаммов *R. erythropolis* в качестве биокатализаторов энантиоселективного восстановления кетонов исследовали трансформацию ацетофенона (1) и 6-метил-5-гептен-2-она (2) в присутствии низкой (5%-ной) концентрации спирта (табл. 1). В качестве контроля использовали реакционную смесь без микроорганизмов.

В результате исследования было обнаружено, что все штаммы энантиоселективно восстанавливают оба субстрата (1, 2) в спирты S-конфигурации: S-1-фенилэтанол (3) и S-6-метил-5-гептен-2-ол (4) соответственно (табл. 1). Наиболее высокий выход продукта (около 86–96%) был достигнут в реакции восстановления 6-метил-5-гептен-2-она (2). При использовании в качестве субстрата ацетофенона (1) выход продукта составил 51–79%. В контрольном варианте без микроорганизмов реакция восстановления кетонов не протекала.

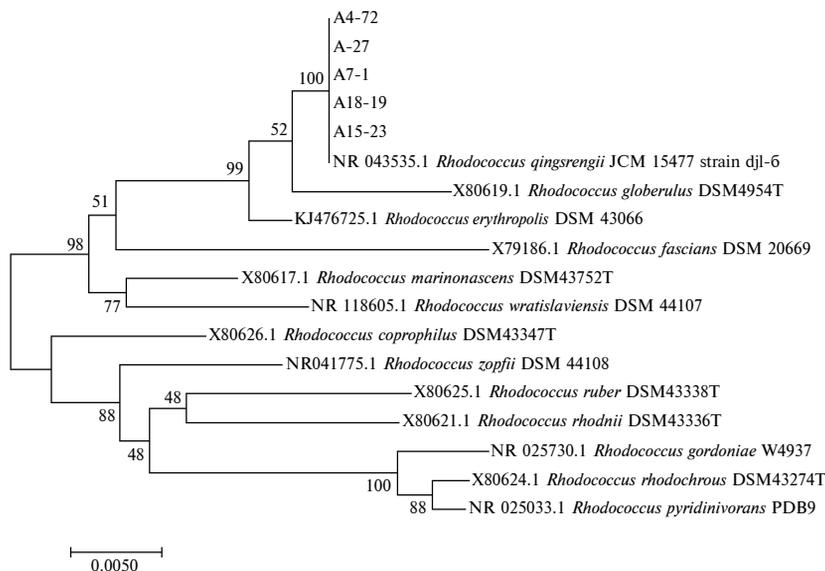
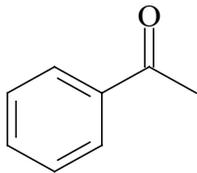
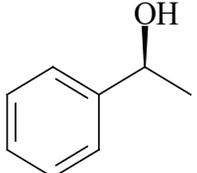
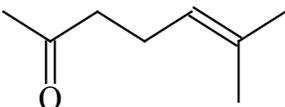
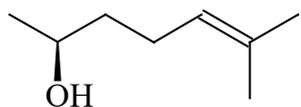


Рис. 1. Положение исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”. Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Таблица 1. Выход (P, %) и энантиомерный избыток (ee, %) продуктов восстановления 6-метил-5-гептен-2-она и ацетофенона с помощью штаммов *R. erythropolis* в буфере, содержащем 5% изопропанола, в течение 2 ч

Субстрат	Штамм	Продукт	P, %	ee, %
 ацетофенон (1)	A-27	 S-1-фенилэтанол (3)	79 ± 3.2	99.1 ± 0.1
	A18-19		65 ± 2.7	99.3 ± 0.1
	A4-72		64 ± 2.4	99.2 ± 0.1
	A7-1		51 ± 2	98.4 ± 0.3
	A15-23		64 ± 2.4	98.7 ± 0.2
 6-метил-5-гептен-2-он (2)	A-27	 S-6-метил-5-гептен-2-ол (4)	93 ± 2.5	99.9 ± 0.1
	A18-19		96 ± 2.3	99.9 ± 0.1
	A4-72		93 ± 2	99.9 ± 0.1
	A7-1		93 ± 2.4	99.9 ± 0.1
	A15-23		86 ± 2.1	69.0 ± 0.5

Исследование энантиомерного состава продуктов трансформации показало, что три штамма *R. erythropolis* (A-27, A18-19 и A4-72) позволяют получать S-1-фенилэтанол и S-6-метил-5-гептен-2-ол высокой энантиомерной чистоты (не менее 99.9% ee, табл. 1). В случае штамма *R. erythropolis* A7-1 продукт с энантиомерным избытком 99.9% был получен только в реакции восстановления 6-метил-5-гептен-2-она (2). При восстановлении ацетофенона (1) с помощью этого штамма, также как и штамма *R. erythropolis* A15-23, был получен

S-1-фенилэтанол более низкой энантиомерной чистоты (98.4 и 98.7% ee соответственно). Наименее селективно протекала реакция восстановления алкенкетона (2) с помощью штамма *R. erythropolis* A15-23, приводящая к S-6-метил-5-гептен-2-олу с низким энантиомерным избытком (69% ee).

Влияние начальной концентрации изопропанола на восстановление кетонов. С целью выявления оптимальной концентрации со-растворителя и оценки устойчивости к нему клеточных биокатализаторов далее было исследовано влияние изо-

пропанола на начальную скорость реакции, выход и энантиомерную чистоту продуктов.

При исследовании влияния концентрации изопропанола на начальную скорость восстановления кетонов (**1** и **2**) с помощью клеток штаммов *R. erythropolis* установлено, что в отсутствие спирта обе реакции протекают медленно (рис. 2). Внесение спирта в оптимальных концентрациях существенно ускоряло процессы восстановления кетонов, что подтверждало роль изопропанола как экзогенного восстановителя.

Оптимальные значения концентрации изопропанола в реакционной смеси варьировали в зависимости от используемого субстрата и штамма (рис. 2). Так, трансформация ацетофенона в *S*-1-фенилэтанол в присутствии клеток большинства исследуемых штаммов наиболее быстро протекала в буфере, содержащем 5%-ный изопропанол (рис. 2а), тогда как в случае использования *R. erythropolis* А-27 оптимальная концентрация спирта была 7.5%. При восстановлении 6-метил-5-гептен-2-она с помощью большинства штаммов, наибольшая скорость реакции достигалась при 10%-ном содержании изопропанола в буфере, а в случае *R. erythropolis* А18-19 — при 20%-ной концентрации спирта (рис. 2б).

Дальнейшее увеличение концентрации изопропанола до 20% приводило к значительному снижению скорости восстановления ацетофенона независимо от используемого штамма, а при 30–40% спирта реакция не протекала (рис. 2а).

В тоже время восстановление 6-метил-5-гептен-2-она с помощью исследуемых штаммов, хотя и медленнее, чем в оптимальных условиях, происходило в присутствии 40% изопропанола, а в случае наиболее активного штамма *R. erythropolis* А-27 осуществлялось даже в 50%-ном изопропанолe с высокой скоростью (рис. 2б).

При исследовании выхода продуктов, полученных при двухчасовой продолжительности реакции восстановления 6-метил-5-гептен-2-она, было установлено, что он достигал максимального значения не только при оптимальной концентрации изопропанола, обеспечивающей наибольшую начальную скорость реакции, но и при большем содержании спирта (рис. 3а). В случае штаммов *R. erythropolis* А18-19, А7-1 и А15-23 концентрация изопропанола может быть увеличена до 20%, а при использовании *R. erythropolis* А4-72 и А-27 — до 40 и 50% соответственно. Анализ энантиомерного состава полученных продуктов показал, что в отсутствие изопропанола большинство штаммов, за исключением *R. erythropolis* А18-19, восстанавливали кетон (**2**) с низкой энантиоселективностью. Увеличение концентрации изопропанола приводило к улучшению энантиомерного состава *S*-6-метил-5-гептен-2-ола (рис. 3б). Даже с наименее селектив-

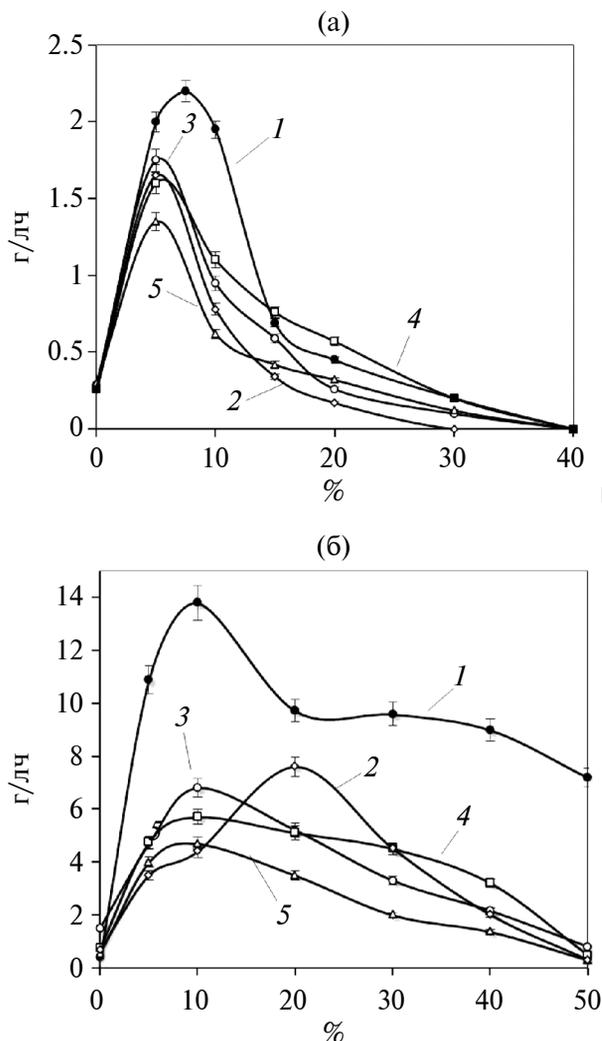


Рис. 2. Зависимость начальной скорости (г/л·ч) восстановления ацетофенона (а) и 6-метил-5-гептен-2-она (б) от концентрации изопропанола (%) в присутствии клеток штаммов *R. erythropolis*: 1 — А-27; 2 — А18-19; 3 — А4-72; 4 — А7-1; 5 — А15-23.

ным штаммом *R. erythropolis* А15-23 в присутствии 40–50% изопропанола образовывался продукт с энантиомерным избытком 99.9%.

При исследовании восстановления ацетофенона было обнаружено, что наибольший выход *S*-1-фенилэтанола (при 4-х часовой продолжительности реакции) в присутствии клеток большинства штаммов, за исключением *R. erythropolis* А-27, достигается только при оптимальной концентрации изопропанола (рис. 4а). В случае *R. erythropolis* А-27 высокий выход продукта был получен также при 10%-ной концентрации спирта. Установлено, что увеличение концентрации изопропанола при использовании штаммов *R. erythropolis* А-27 и А18-19 не оказывало существенного влияния на энантиомерную чистоту *S*-1-фенилэтанола, но снижало ее при использо-

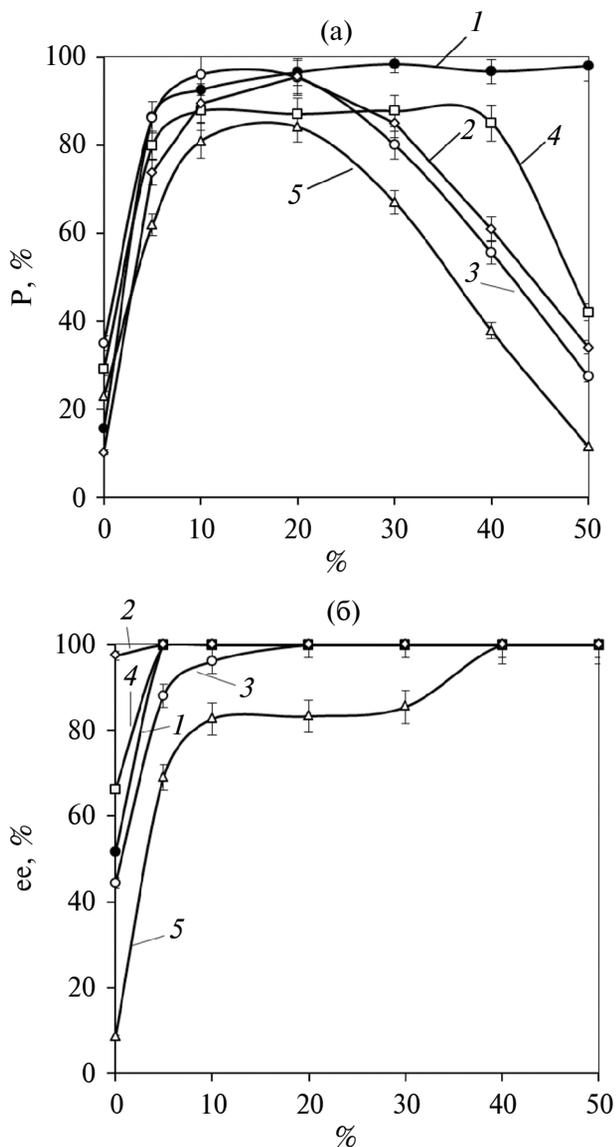


Рис. 3. Зависимость выхода (а, Р, %) и энантиомерного избытка *S*-6-метил-5-гептен-2-ола (б) от начальной концентрации изопропанола (%) в процессе восстановления 6-метил-5-гептен-2-она с помощью клеток штаммов *R. erythropolis*: 1 — А-27; 2 — А18-19; 3 — А4-72; 4 — А7-1; 5 — А15-23.

вании штамма *R. erythropolis* А4-72 и увеличивало при использовании штаммов *R. erythropolis* А7-1 и А15-23 (рис. 4б).

Динамика восстановления кетонов при оптимальной концентрации изопропанола. Исследование динамики восстановления ацетофенона при оптимальной концентрации изопропанола показало, что после 2 ч трансформации скорость

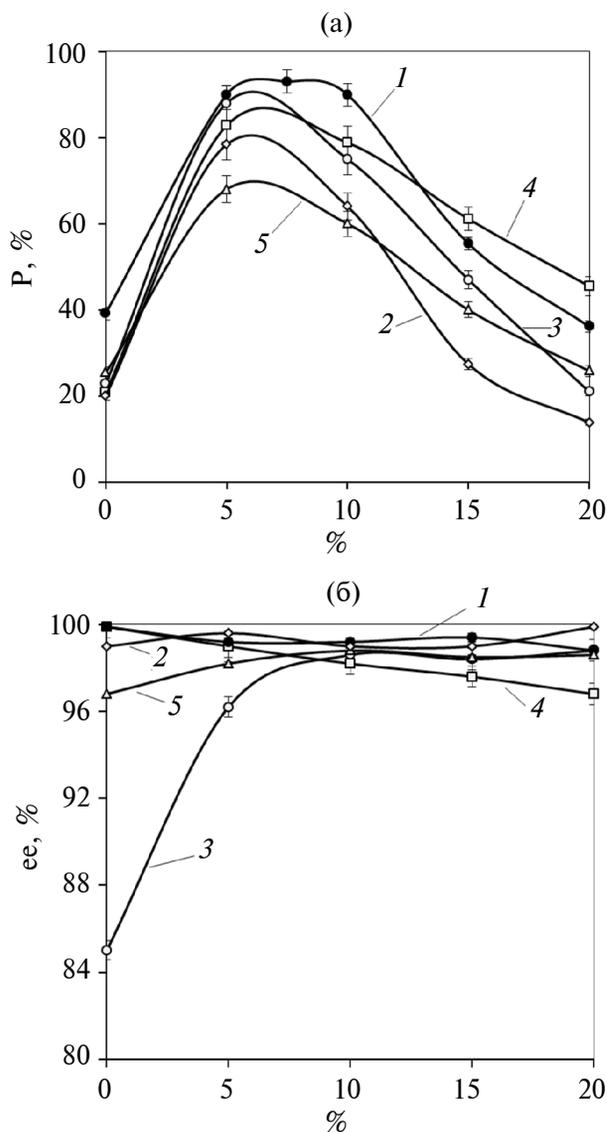


Рис. 4. Зависимость выхода (а, Р, %) и энантиомерного избытка (б, ee, %) *S*-1-фенилэтанола от начальной концентрации изопропанола (%) при восстановлении ацетофенона с помощью клеток штаммов *R. erythropolis*: 1 — А-27; 2 — А18-19; 3 — А4-72; 4 — А7-1; 5 — А15-23.

реакции существенно снижалась, что ограничивало выход продукта на уровне 68–92% (рис. 5а). Такое замедление реакции биовосстановления кетонов в присутствии изопропанола может быть связано с накоплением продукта окисления этого спирта (ацетона) в реакционной смеси [15, 38, 39]. Наиболее высокий выход ~ 92% *S*-1-фенилэтанола в исследуемых условиях был получен с помощью штамма *R. erythropolis* А-27. Для достижения более высокого выхода целевого продукта необходимо удалять ацетон *in situ* [15, 38, 39].

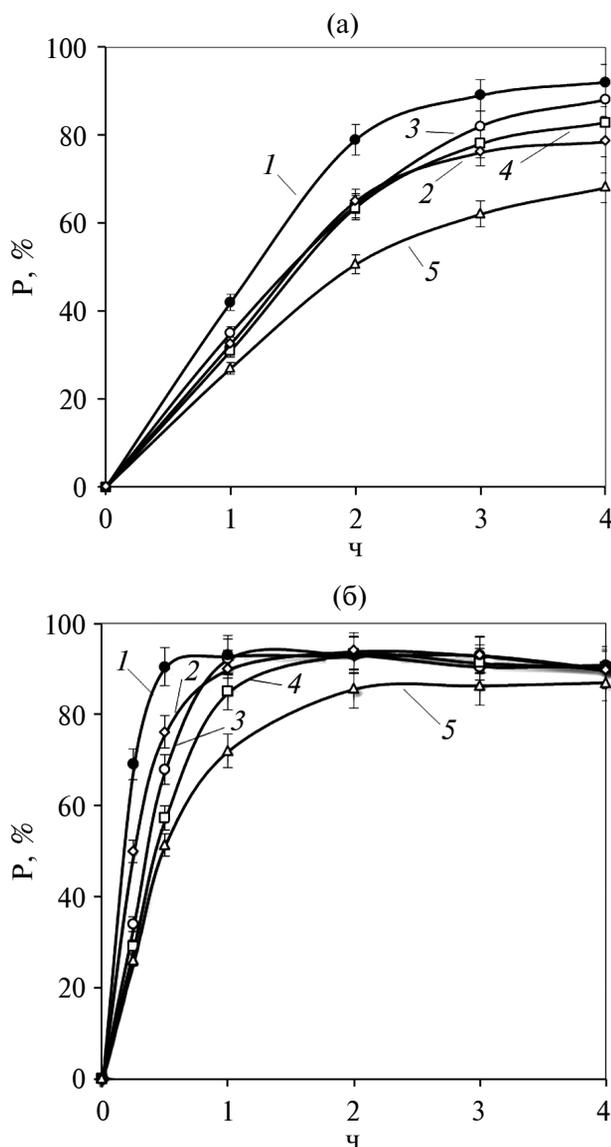


Рис. 5. Динамика выхода продуктов реакции (P, %) в процессе восстановления ацетофенона (а) и 6-метил-5-гептен-2-она (б) с помощью клеток штаммов *R. erythropolis* при оптимальных начальных концентрациях изопропанола: 1 — А-27; 2 — А18-19; 3 — А4-72; 4 — А7-1; 5 — А15-23.

Аналогичные результаты были получены при восстановлении 6-метил-5-гептен-2-она (рис. 5б). Однако в отличие от ацетофенона, большинство штаммов восстанавливало кетон (2) с выходом продукта близким к 93–94%. Только при использовании штамма *R. erythropolis* А15-23 выход продукта оставался на уровне 86%. Следует отметить, что время реакции, необходимое для достижения максимального выхода продукта (4), может быть сокращено до 0.5–1 ч при использовании наиболее активных штаммов *R. erythropolis* А-27, А18-19 и А4-72.

В результате текущего контроля энантиомерного состава продуктов (3 и 4), образующихся при восстановлении кетонов (1, 2), было обнаружено, что использование наименее активного штамма *R. erythropolis* А15-23 энантиомерный избыток продуктов в начале реакции увеличивался (табл. 2), но останавливался на уровне около 85% для *S*-6-метил-5-гептен-2-ола и 98.5% для *S*-1-фенилэтанола.

При использовании в качестве биокатализатора клеток *R. erythropolis* А7-1 было обнаружено, что только при восстановлении 6-метил-5-гептен-2-она в ходе реакции образуется высокочистый *S*-6-метил-5-гептен-2-ол (табл. 2). В случае ацетофенона энантиомерный избыток *S*-1-фенилэтанола снижался с 99.3 до 96.2% с увеличением продолжительности реакции от 1 до 4 ч. Подобное снижение энантиомерного избытка *S*-1-фенилэтанола в ходе реакции наблюдалось у ряда штаммов *R. erythropolis*, как полагают, из-за присутствия в клетках альтернативного фермента, катализирующего восстановление субстрата преимущественно в *R*-1-фенилэтанол [17, 31].

В то же время было установлено, что в случае трех штаммов *R. erythropolis* (А-27, А18-19 и А4-72) в ходе реакции образуются спирты исключительно высокой энантиомерной чистоты (не менее 99% *ee*, табл. 2).

Таким образом, полученные результаты показали, что штаммы *R. erythropolis*, выделенные из различных антропогенно загрязненных экосистем, отличались друг от друга своим биокаталитическим потенциалом в процессах энантиоселективного восстановления кетонов. Это соответствует имеющимся представлениям о внутривидовом полиморфизме родококков, формирующемся в результате развития штаммов в различных экосистемах [40].

Наиболее перспективным для применения в процессах энантиоселективного восстановления кетонов является штамм *R. erythropolis* А-27, выделенный из почвы, загрязненной нефтепродуктами, который показал наибольшую активность и высокую энантиоселективность в процессах восстановления обоих субстратов (1, 2).

Отличительная особенность *R. erythropolis* А-27 как биокатализатора процессов энантиоселективного восстановления кетонов, протекающих в присутствии изопропанола, — более высокая устойчивость к высоким концентрациям спирта по сравнению с другими штаммами данного вида, представленными в настоящей работе, а также описанными в литературе [17, 41, 42]. Подобно известному наиболее устойчивому штамму *R. ruber* DSM 44541, нашедшему широкое применение в асимметрическом синтезе различных вторичных спиртов [3, 32–34], клетки штамма *R. erythropolis* А-27 способны восстанавливать 6-метил-5-гептен-2-он в энантиомерно чистый *S*-6-метил-5-

Таблица 2. Изменение энантиомерного избытка (*ee*, %) продуктов (**3**, **4**) в процессе восстановления ацетофенона и 6-метил-5-гептен-2-она с помощью штаммов *R. erythropolis* при оптимальных концентрациях изопропанола

Штамм	S-1-фенилэтанол (3)			S-6-метил-5-гептен-2-ол (4)			
	1 ч	2 ч	4 ч	0.25 ч	0.5 ч	2 ч	4 ч
A-27	99.4 ± 0.1	99.1 ± 0.1	99.2 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1
A18-19	99.3 ± 0.1	99.3 ± 0.1	99.5 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1
A4-72	99.3 ± 0.1	99.2 ± 0.1	99.0 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1
A7-1	99.3 ± 0.1	98.7 ± 0.1	96.2 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1
A15-23	97.2 ± 0.2	98.2 ± 0.2	98.5 ± 0.2	73.4 ± 0.5	83.4 ± 0.5	85.6 ± 0.5	84.6 ± 0.5

гептен-2-ол даже в 50%-ном изопропаноле. Как показано для штамма *R. ruber* DSM 44541, в этих условиях процесс может протекать с высокой скоростью при очень высокой концентрации плохо растворимого в воде субстрата (95.2 г/л 6-метил-5-гептен-2-она) [34]. Это делает перспективным дальнейшее исследование свойств найденного биокатализатора с целью разработки на его основе эффективных методов получения практически важных гидрофобных спиртов, в том числе S-1-фенилэтанола — предшественника в синтезе ряда лекарственных соединений [43–45], и S-6-метил-5-гептен-2-ола, на базе которого могут быть синтезированы экологически безопасные инсектициды [36, 46, 47].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

В настоящей статье не использовались в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldberg K., Schroer K., Lütz S., Liese A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. P. 249–255.
- Patel R.N. // Coord. Chem. Rev. 2008. V. 252. P. 659–701.
- Musa M.M., Phillips R.S. // Catal. Sci. Technol. 2011. V. 1. P. 1311–1323.
- Milner S.E., Maguire A.R. // ARKIVOC. 2012. P. 321–382.
<http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.109>
- Kratzer R., Woodley J.M., Nidetzky B. // Biotechnology Advances. 2015. V. 33. P. 1641–1652.
- de Carvalho C.C.C.R. // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. № 2. P. 250–263.
- Hollmann F., Opperman D.J., Paul C.E. // Angew. Chem. Int. Ed. 2021. V. 60. P. 5644–5665.
- Simić S., Zukić E., Schmermund L., Faber K., Winkler Ch.K., Kroutil W. // Chem. Rev. 2022. V. 122. P. 1052–1126.
- Aranda C., de Gonzalo G. // Molecules. 2020. V. 25(13). Article 3016.
<https://doi.org/10.3390/molecules25133016>
- Sorgedraeger M.J., van Rantwijk F., Huisman G.W., Sheldon R.A. // Adv. Synth. Catal. 2008. V. 350. P. 2322–2328.
- Jia Q., Zheng Yu.-C., Li H.-P., Qian X.-L., Zhang Zhi.-J., Xu J.-H. // Appl. Environ. Microbiol. 2022. V. 88. № 9. P. 1–16.
- Itoh N., Isotani K., Nakamura M., Inoue K., Isogai Y., Makino Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. № 93. P. 1075–1085.
- Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Зорин В.В. // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20. № 4. С. 59–63.
- Коршунова И.О., Писцова О.Н., Куюкина М.С., Ившина И.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 53–61.
- Yang Z., Fu H., Ye W., Xie Y., Liu Q., Wang H., Wei D. // Catal. Sci. Technol. 2020. № 10. P. 70–78.
- Митягина А.В., Петухова Н.И., Прищепов Ф.А., Зорин В.В. // Башкирский химический журнал. 2021. Т. 28. № 3. С. 41–46.
- Митягина А.В., Рахманов Т.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. // Башкирский химический журнал. 2022. Т. 29. № 1. С. 29–36.
- Xu S., Lin Q., Chen W., Lin R., Shen Y., Tang P. et al. // Catalysts. 2023. V. 13(1). Article 52.
<https://doi.org/10.3390/catal13010052>
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 28. P. 1037–1051.
- Busch H., Hagedoorn P.-L., Hanefeld U. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Article 4787.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194787>
- Qin L., Wu L., Nie Y., Xu Y. // Catal. Sci. Technol. 2021. V. 11. P. 2637–2651.
- Ivshina I., Bazhutin G., Tyumina E. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Article 967127.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967127>
- Hibino A., Ohtake H. // Process Biochemistry. 2013. V. 48. P. 838–843.

24. Honda K., Ono T., Okano K., Miyake R., Dekishima Y., Kawabata H. // *J. Biosci. Bioeng.* 2019. V. 127. № 2. P. 145–149.
25. Kosjek B., Stampfer W., Pogorevc M., Goessler W., Faber K., Kroutil W. // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 86. P. 55–62.
26. de Gonzalo G., Lavandera I., Faber K., Kroutil W. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. № 11. P. 2163–2166.
27. Yang C., Ying X., Yu M., Zhang Y., Xiong B., Song Q., Wang Z. // *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 39. P. 1431–1443.
28. Stankeviciute J., Kutanovas S., Rutkiene R., Tauraitė D., Striela R., Meskys R. // *Peer J.* 2015. V. 3. Article e1387.
<https://doi.org/10.7717/peerj.1387>
29. Xu G.-Ch., Tang M.-H., Ye Ni // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 2016. V. 123. P. 67–72.
30. Hu J., Li G., Liang C., Shams S., Zhu S., Zheng G. // *Process Biochemistry.* 2020. V. 92. P. 232–243.
31. Hummel W., Abokitse K., Drauz K., Rollmann C., Gröger H. // *Adv. Synth. Catal.* 2003. V. 345. P. 153–159.
32. Stampfer W., Kosjek B., Moitzi C., Kroutil W., Faber K. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002. V. 41. P. 1014–1017.
33. Stampfer W., Kosjek B., Faber K., Kroutil W. // *J. Org. Chem.* 2003. V. 68. P. 402–406.
34. Stampfer W., Kosjek B., Kroutil W., Faber K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 81. № 7. P. 865–869.
35. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed. / Eds. F.M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl N.Y.: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.
36. Ишмуратов Г.Ю., Газетдинов Р.Р., Выдрин В.А., Харисов Р.Я., Яковлев М.П., Муслухов Р.Р. и др. // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. № 4. С. 1691–1699.
37. Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Зорин В.В. // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20. № 4. С. 59–63.
38. Schroer K., Tacha E., Lutz S. // *Org. Process Res. Dev.* 2007. V. 11. № 5. P. 836–841.
39. Calvin S.J., Mangan D., Miskelly I., Moody T.S., Stevenson P.J. // *Org. Process Res. Dev.* 2012. V. 16. P. 82–86.
40. Чернявская М.И., Букляревич А.А., Делеган Я.А., Охремчук А.Э., Филонов А.Е., Титок М.А. // *Микробиология.* 2018. Т. 87. № 5. С. 581–594.
41. Yang C., Ying X., Yu M., Zhang Y., Xiong B., Song Q., Wang Z. // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2012. V. 39. P. 1431–1443.
42. Chen H., Qian F., Lin H., Chen W., Wang P. // *Catalysts.* 2020. V. 10. Article 30.
<https://doi.org/10.3390/catal10010030>
43. Costa L.F.A., Lemos F., Ramôa Ribeiro F., Cabral J.M.S. // *Catalysis Today.* 2008. V. 133. P. 625–631.
44. Vieira G., de Freitas Araujo D., Lemos T., de Mattos M., de Oliveira M., Melo V. et al. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2010. V. 21. № 8. P. 1509–1516.
45. Шейко Е.А., Медникова Е.Э., Воробьева Т.Е., Чаньшеева А.Р. // Башкирский химический журнал. 2018. Т. 25. № 1. С. 55–58.
46. Mori K., Puapoomchareon P. // *Liebigs Ann. Chem.* 1989. P. 1261–1262.
47. Flechtman C.A.H., Berisford C.W. // *J. Appl. Ent.* 2003. V. 127. P. 189–194.

***Rhodococcus erythropolis* A-27 as a Biocatalyst for Enantioselective Reduction of Ketones in the Presence of High Concentrations of Isopropanol**

N. I. Petukhova^{a,**}, A. V. Mityagina^{a,*}, and V. V. Zorin^a

^aUfa State Petroleum Technological University, Ufa, 450062 Russia

*e-mail: a_mityagina@mail.ru

**e-mail: biocatNP@yandex.ru

It has been shown that in the presence of the cells of five strains of *Rhodococcus erythropolis*, isolated from various anthropogenically polluted ecosystems, and an exogenous reducing agent (isopropanol), enantioselective reduction of ketones (acetophenone and 6-methyl-5-hepten-2-one) occurs with the formation of the corresponding S-configuration alcohols with high enantiomeric excess. Using the most active strain of *R. erythropolis* A-27 at the optimal concentration of isopropanol, products (S-1-phenylethanol and S-6-methyl-5-hepten-2-ol) were obtained with an enantiomeric excess of at least 99.9 % and a yield of 92 and 93% respectively. This strain was found to be tolerant to isopropanol and could effectively reduce 6-methyl-5-hepten-2-one to S-6-methyl-5-hepten-2-ol in a buffer containing 50% isopropanol.

Keywords: *Rhodococcus erythropolis*, enantioselective biocatalysis, bioreduction of ketones, S-6-methyl-5-hepten-2-ol, S-1-phenylethanol