1. Sato M., Watanabe J., Uematsu K. // J. Sol. State Chem. 1993. Vol.107. P.460.
2. Sato M., Jin T., Uematsu K. // J. Sol. State Chem. 1993. Vol.102. P.557.
3. Portelles J., Gonzales I., Kiriev A. et al. // J. Materials Sci. Lett. 1993. Vol.12. P.1871.
4. Kim I.-T., Oh T.-S., Kim Y.-H. // J. Materials Sci. Lett. 1993. Vol.12. P.182.
5. Tanaka J., Tsukioka M., Miyazawa Y. et al. // Solid State Communications. 1980. Vol.34. P.221.
6. El-Elshereafy E., Abou Sekkina M.M. // J. Materials Sci. Lett. 1994. Vol.13. P.37.
7. Wang B., Chen S.C., Greenblatt M. // J. Sol. State Chem. 1994. Vol.108. P.184.
8. Manoharan R., Goodenough J.B. // J. Electrochem. Soc. 1990. Vol.137. №3. P.910.
9. Kharton V.V., Naumovich E.N., Vecher A.A., Nikolaev A.V. // J. Sol. State Chem. 1995. Vol.120. P.128.
10. Хартон В.В., Наумович Е.Н., Николаев А.В. и др. // Электрохимия. 1993. Т.29. Вып.10. С.1201.
11. Чеботин В.Н. Химическая диффузия в твердых телах. М., 1989.
12. Powder Difraction Files (ASTM). Card №22-471.

Поступила в редакцию 04.08.97.

УДК 573.6.086.83;663.1

Т.И.СОКОЛЬЧИК, Г.ВЕСШАМБРЭ, П.БЭСС, В.Н.ЛЕОНТЬЕВ

ДИАСТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ α-ХЛОРГИДРИНОВ

Stereochemistry of 5-chlornonanone-4 and 4-chloroctanone-3 reduction by fungi Mortierella isabellina and yeast Saccharomyces cerevisiae was investigated. The optically pure diastereomers of corresponded α-chlorhydrines with S-configuration of carrying OH-group carbon atom was received as a result.

α-Галогенгидрины широко применяются в органическом синтезе главным образом в качестве удобных реагентов для получения через оксираны оптически активных диолов, амино-, тио-, азидоспиртов, многие из которых обладают биологической активностью и могут быть использованы для производства лекарственных препаратов, инсектицидов и др. [1]. Химические методы, за исключением восстановления α-галогенкетонов асимметрическими агентами [2], не позволяют получать хиральные α-галогенгидрины с высокой энантиомерной чистотой. Вместе с тем известно, что биохимические реакции, происходящие в живых клетках и катализируемые ферментами, отличаются высокой стереоселективностью [3]. Поэтому биотрансформация начинает успешно конкурировать с химическим синтезом. Причем изучаются как чистые ферменты [4], так и ферментные системы дрожжей [5], бактерий и грибов [6,7]. Восстановление α-галогенгидринов могут катализировать различные оксидоредуктазы, в частности в работах [4,8] описано восстановление алифатических и ароматических α-галогенкетонов лактатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.27) и алкогольдегидрогеназой (КФ 1.1.1.1), выделенными из разных источников. Однако в литературе отсутствуют сведения о микробиологическом восстановлении 5-хлорнонанона-4 и 4-хлороктанона-3. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать восстановление каждого из этих α-хлоркетонов несколькими различными микроорганизмами и провести сравнительный анализ стереохимии образующихся α-хлоргидринов.

Материал и методика

Были использованы штамм мицелиального гриба Mortierella isabellina NRRL 1757 и коммерческий препарат лиофилизированных пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Штамм M.isabellina выращивали на среде следующего состава (г/л): 5 – дрожжевой экстракт (DIFCO), 5 – экстракт сои (ROQUETTE), 4 – глюкоза, 5 – NaCl, 5 – KH_2PO_4, дистиллированная вода. Клетки M.isabellina культивировали в условиях аэрации при 27°С в течение 48 ч.

Условия биоконверсии: предварительно выращенные на питательной среде указанного состава и тщательно отмытые физиологическим раствором (0,8% NaCl) от ростовой среды клетки микроорганизма периодически культивировали при 27°С с аэрацией в течение 6, 24 и 48 ч на воде с хлоркетоном (1 г/л).

Концентрация сырой биомассы составляла 100 г/л. Затем клетки отделяли фильтрованием или центрифугированием. Супернатант экстрагировали диэтиловым эфиром в течение 24 ч, эфирную фазу высушивали $MgSO_4$, а эфир выпаривали под вакуумом.

В случае применения S.cerevisiae биоконверсию осуществляли с использованием 1 г лиофилизированных дрожжей на 50 мл воды.

α-Хлоркетоны (5-хлорнонанон-4 и 4-хлороктанон-3) синтезировали по методу [9] в виде рацемической смеси.

Степень конверсии α-хлоркетонов определяли методом ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке размером 0,32 мм x 50 м с неподвижной фазой Carbowax 20M.

Диастереомеры хлоргидринов выделяли хроматографией на силикагеле в колонке размером 1×100 см в системе пентан/диэтиловый эфир (95/5).

Энантиомерную чистоту каждого диастереомера рассчитывали на основании ГЖХ на капиллярной колонке размером 0,32 мм × 25 м с хиральной неподвижной фазой Lipodex E.

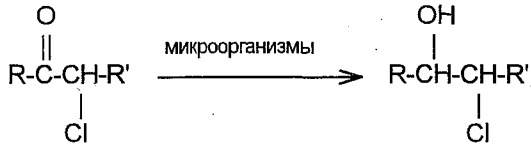
Конфигурацию хиральных центров устанавливали на основании анализа ПМР спектров, которые регистрировали на приборе BRUKER AC 400 с рабочей частотой 400 МГц.

Удельное вращение $[\alpha]_D^{25}$ продуктов микробиологического восстановления определяли поляриметрически (JASCO DIP 370, λ=589 нм) в хлороформе.

Результаты и их обсуждение

Выбор указанных микроорганизмов обусловлен результатами, полученными сотрудниками Лаборатории биоорганической химии химического факультета Университета г.Клермон-Феррана (Франция) в процессе изучения микробиологического восстановления различных моно- и α- и β-дикарбонильных соединений [6,10,11].

С целью определения наилучших условий образования α-хлоргидрина (1) сначала с каждым микроорганизмом проводили кинетические исследования (время инкубирования 6, 24 и 48 ч), определяя степень конверсии α-хлоркетона в хлоргидрин по данным ГЖХ.



где R= C_2H_5 или C_3H_7, R'= C_4H_9.

В результате время реакции биоконверсии с учетом наибольшей трансформации хлоркетона и наименьшей метаболизации образующихся хлоргидринов составляло для S.cerevisiae 48 ч при использовании 5-хлорнонанона-4 и 24 ч при использовании 4-хлороктанона-3, для M.isabellina – 6 ч при использовании обоих субстратов.

Данные ПМР спектров диастереомеров 4-хлороктанола-3 и 5-хлорнонанола-4, полученных нами путем микробиологического восстановления соответствующих α-хлоркетонов и выделенных с помощью жидкостной колоночной хроматографии, представлены в табл.1.

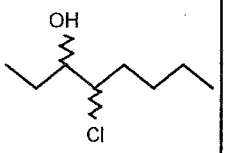
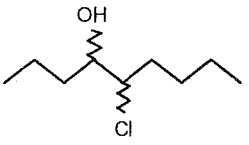
Как видно, *син*-изомеры имеют меньшие химические сдвиги протонов у атомов углерода хлоргидринного фрагмента молекулы, что согласуется с данными литературы [12].

В табл.2 представлены количественные исследования по стереохимии микробиологического восстановления алифатических α-хлоркетонов.

Из имеющихся в литературе сведений [13], данных табл.1 и сравнения знака удельного вращения диастереомеров хлоргидринов следует, что *син*-изомеры конфигурации (S,S) имеют отрицательное удельное вращение, *анти*-изомеры конфигурации (S,R) – положительное удельное вращение при условии восстановления каждого субстрата одним и тем же микроорганизмом.

Таблица 1

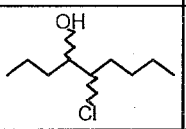
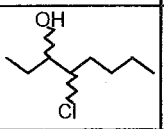
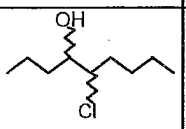
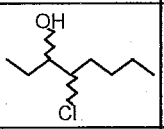
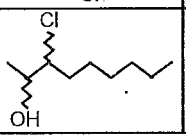
Данные ПМР спектров α-хлоргидринов, полученных микробиологическим восстановлением

Структура α-хлоргидрина	Диастереомеры	Спектральные характеристики δ, м.д. ($CDCl_3$) (мультиплетность, интегральная интенсивность)
	*син-*	0,90 (т, J=7 Гц, 3Н); 0,95 (т,J=7 Гц, 3Н);1,25-1,65 (м,3х2Н); 1,75-1,80 (м,2Н); 2,38 (с,1Н); 3,50-3,55 (м,1Н); 3,86-3,92 (м,1Н)
	анти-	0,90 (т,J=7 Гц,3Н); 1,00 (т,J=7 Гц,3Н); 1,30-1,70 (м,3х2Н); 1,70-1,80 (м,2Н); 3,62-3,70 (м,1Н); 3,98-4,05 (м,1Н)
	*син-*	0,85-0,95 (м,2х3Н); 1,25-1,40 (м,4х2Н); 1,80-1,95 (м,2Н); 3,55-3,60 (м,1Н); 3,85-3,92 (м,1Н)
	анти-	0,85-1,00 (м,2х3Н); 1,30-1,85 (м,5х2Н); 3,70-3,80 (м,1Н); 4,00-4,05 (м,1Н)

Примечание: с – синглет, т – триплет, м – мультиплет.

Таблица 2

Сравнительные данные стереохимии микробиологического восстановления

Микроорганизмы	Полученные хлоргидрины	Общий выход, %	Диастереомеры	Соотношение изомеров, %	$[\alpha]_D^{25}$	Энантиомерный избыток е.е., %	Абсолютная конфигурация
S.cerevisiae		15,0	*син-*	58	–35	98	4S,5S
			анти-	42	+8	98	4S,5R
		13,0	*син-*	70	–28	95	3S,4S
			анти-	30	+17	95	3S,4R
M.isabelina		5,0	*син-*	90	–9	30	4S,5S
			анти-	10	–	–	–
		15,0	*син-*	50	–17	87	3S,4S
			анти-	50	+14	94	3S,4R
S.cerevisiae		61,0	*син-*	89	–33	98	2S,3S
			анти-	11	+27	98	2S,3R

Примечание: * – данные взяты из [13].

Абсолютная конфигурация полученных нами хлоргидринов была установлена на основании сравнения с конфигурацией родственных соединений, образующихся при помощи одного и того же микроорганизма (S.cerevisiae) [13], в соответствии с правилом Кана–Ингольда–Прелога.

Все полученные нами диастереомеры хлоргидринов имеют S-конфигурацию атома углерода, связанного с гидроксильной группой, хотя известна возможность образования хлоргидринов с R-конфигурацией данного атома углерода [14].

Низкие выходы полученных диастереомеров, в особенности в случае использования M.isabellina, на наш взгляд, можно объяснить достаточно высокой скоростью их метаболизации. Причем для M.isabellina наблюдается также и низкая энантиоселективность.

***

Таким образом, независимо от конфигурации атома углерода, несущего хлор, восстановление карбонильной группы у обоих исходных α-хлоркетонов происходит стереоселективно, причем оба микроорганизма образуют хлоргидрины с S-конфигурацией атома углерода, связанного с гидроксильной группой. Такое направление восстановления является, вероятно, специфическим свойством ферментных систем выбранных микроорганизмов.

1. Bartlett P.A. Asymmetric Synthesis / Ed. by J.D.Morrison. New York, 1984. Vol.3. P.411.
2. Itsuno S., Ito K., Hirao A., Nakahama S. // J.Chem.Soc., Chem.Commun., 1983. P.469.
3. Grout D.H.C. Warld Biotechnology Report, Proceeding of Biotechnology'86. London, 1986. P.13.
4. Hirschbein B.L., Whitesides G.M. // J.Am.Chem.Soc. 1982. Vol.104. P.4458.
5. Servi S. // Synthesis. 1990. P.1.
6. Belan A., Bolte J., Fauve A. et al. // J.Org.Chem. 1987. Vol.52. P.256.
7. Nakamura K., Kawai Y., Kitayama T. et al. // Bull.Inst.Chem.Res. 1989. Vol.67. P.157.
8. Tanner D.D., Stein A.R. // J.Org.Chem. 1988. Vol.53. P.1642.
9. Hooz J., Bridson J.N. // Canad.J.Chem. 1972. Vol.50. P.2387.
10. Bel-Rhlid R., Fauve A., Renard M., Veschambre H. // Biocatalysis. 1992. Vol.6. P.319.
11. Fauve A., Veschambre H. // Biocatalysis. 1990. Vol.3. P.95.
12. Besse P. These Universite Blaise Pascal. Clermont-Ferrand, 1993. №556.P.299.
13. Utaka M., Kohishi S., Takeda A. // Tetrahedron Lett. 1986. Vol.27. P.4737.
14. Carvalho M., Okamoto M.T. // Tetrahedron. 1991. Vol.47. P.2073.

Поступила в редакцию 01.07.97.