



## Использование бактериальной целлюлозы в процессе получения энзиматически активной биомассы дрожжей *Debaryomyces hansenii* – биокатализатора энантиоселективного восстановления ацетофенона в S-1-фенилэтанол

Н.И. Петухова, С.А. Колобова✉, В.В. Зорин

Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Российская Федерация

**Аннотация.** Работа посвящена исследованию возможности применения биокомпозита на основе бактериальной целлюлозы и дрожжей *Debaryomyces hansenii* в энантиоселективном биокатализе для получения энантиомерно чистых вторичных спиртов. В результате тестирования трех штаммов дрожжей *Debaryomyces hansenii* выявлен штамм Д-43-1, биомасса которого в присутствии экзогенного восстановителя (изопропанола) энантиоселективно восстанавливает ацетофенон в S-1-фенилэтанол высокой энантиомерной чистоты (не менее 99%). Иммобилизацией клеток *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 на гель-пленке бактериальной целлюлозы получен биокомпозит для исследования эффективности его использования в качестве биокатализатора для восстановления ацетофенона или иммобилизованного инокулята для получения биомассы дрожжей с карбонилредуктазной активностью. Установлено, что использование биокомпозита как биокатализатора невозможно: продукт восстановления ацетофенона не обнаруживается в реакционной смеси. В то же время применение биокомпозита в качестве иммобилизованного инокулята позволяет интенсифицировать процесс получения энзиматически активной биомассы дрожжей, пригодной для энантиоселективного восстановления ацетофенона в энантиомерно чистый S-1-фенилэтанол. Выход биомассы, достигнутый с использованием иммобилизованного инокулята в первом цикле ферментации, был в 3 раза больше по сравнению с планктонным инокулятом. В четырех повторных ферментациях в течение 15-часового культивирования стабильно достигается выход биомассы около 13 г/л, который почти в 2 раза превышает уровень, достигнутый за тот же промежуток времени при использовании планктонного посевного материала. Показано, что биомасса, полученная с использованием биокомпозита, может быть использована многократно. При концентрации биомассы 40 г/л (по сухому весу) выход продукта стабильно достигает 86–88% в течение четырех циклов трансформации и только в пятом цикле снижается до 65%.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, *Debaryomyces hansenii*, иммобилизация клеток, энантиоселективный биокатализ, ацетофенон, S-1-фенилэтанол

**Для цитирования:** Петухова Н.И., Колобова С.А., Зорин В.В. Использование бактериальной целлюлозы в процессе получения энзиматически активной биомассы дрожжей *Debaryomyces hansenii* – биокатализатора энантиоселективного восстановления ацетофенона в S-1-фенилэтанол // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 4. С. 515–527. DOI: 10.21285/achb.1005. EDN: GXAQAR.

## Use of bacterial cellulose to produce enzymatically active biomass of *Debaryomyces hansenii* yeast – a biocatalyst for the enantioselective reduction of acetophenone to S-1-phenylethanol

Nadezhda I. Petukhova, Svetlana A. Kolobova✉, Vladimir V. Zorin

Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russian Federation

**Abstract.** The study investigates the potential use of a biocomposite composed of bacterial cellulose and *Debaryomyces hansenii* yeast in enantioselective biocatalysis to produce enantiopure secondary alcohols. As a result of testing three strains of *Debaryomyces hansenii* yeast, it was determined that in the presence of an exogenous reducing agent (isopropanol), the biomass of strain D-43-1 reduces acetophenone enantioselectively to highly enantiopure S-1-phenylethanol (at least 99%). Cell immobilization of the *Debaryomyces hansenii* strain D-43-1 on a bacterial cellulose gel film yielded a biocomposite for the study of its effectiveness as a biocatalyst for acetophenone reduction or as an immobilized inoculum for the production of yeast biomass with carbonyl reductase activity. The use of biocomposite as a biocatalyst was found to be impossible: the product of acetophenone reduction was not detected in the reaction mixture. When used as an immobilized inoculum, biocomposite intensifies the production of enzymatically active yeast biomass suitable for the enantioselective reduction of acetophenone to enantiopure S-1-phenylethanol. The biomass yield achieved in the first fermentation cycle using the immobilized inoculum is three times higher than that produced using the planktonic inoculum. Four repeated fermentations during a 15-hour cell culture consistently achieve a biomass yield of approximately 13 g/L, which is almost twice the level achieved over the same period of time using planktonic inoculum. Biomass obtained using the biocomposite was shown to be reusable. At a biomass dry weight concentration of 40 g/L, the product yield consistently reaches 86–88% during the four transformation cycles, decreasing to 65% only in the fifth cycle.

**Keywords:** bacterial cellulose, *Debaryomyces hansenii*, cell immobilization, enantioselective biocatalysis, acetophenone, S-1-phenylethanol

**For citation:** Petukhova N.I., Kolobova S.A., Zorin V.V. Use of bacterial cellulose to produce enzymatically active biomass of *Debaryomyces hansenii* yeast – a biocatalyst for the enantioselective reduction of acetophenone to S-1-phenylethanol. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(4):515-527. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.1005. EDN: GXAQAR.

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная целлюлоза представляет собой природный полимер, пригодный для создания функциональных композиционных материалов, находящих свое применение в медицине, электронике и электротехнике, текстильной, бумажной и пищевой промышленности [1–5]. Биополимер синтезируется рядом грамотрицательных и грамположительных бактерий, среди которых наиболее эффективными продуцентами являются представители родов *Komagataeibacter* и *Novacetimonas* [2, 3]. При культивировании этих микроорганизмов в статических условиях целлюлоза образуется на границе раздела вода – воздух в виде гель-пленки [6].

Благодаря своей уникальной трехмерной структуре, высокой прочности, влагоудерживающей способности, а также совместимости с живыми организмами гель-пленка бактериальной целлюлозы в настоящее время рассматривается как перспективный носитель для иммобилизации микроорганизмов, позволяющий получать биокomпозитные материалы с заданными практически важными функциями [7, 8]. В частности, на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы и клеток микроорга-

низмов могут быть созданы повязки с антимикробными свойствами для лечения ран [9], упаковки для пищевых продуктов [10], системы доставки пробиотиков [11], компоненты биоэлектрокаталитических устройств (биосенсоров, микробных топливных ячеек [12, 13], сорбенты для адсорбции тяжелых металлов [14], биокатализаторы для трансформации органических соединений [15, 16].

Показано, что биокomпозиты бактериальной целлюлозы с микроорганизмами позволяют интенсифицировать биотехнологические процессы, в том числе биodeградацию экотоксикантов [17, 18], полимеризацию фенольных соединений [15], получение этанола [19], лимонной кислоты [20], лизина [1], атаксантина [21].

Ранее нами был разработан биокomпозит бактериальной целлюлозы с галорезистентными дрожжами *Debaryomyces hansenii* Д-43-1, способными деградировать фенол [17]. Установлено, что в присутствии такого биокomпозита процесс деградации фенола протекает при более высоких концентрациях токсиканта и за более короткий промежуток времени по сравнению с планктонной дрожжевой культурой [17, 22]. Вместе с тем известно, что дрожжи вида *D. hansenii* имеют

большой потенциал биотехнологического и коммерческого применения [23–27]. Они широко используются в пищевой промышленности для производства молочных и мясных продуктов [24, 26]. На их основе разработаны биосенсоры [25], создаются генно-инженерные продуценты рекомбинантных белков и пептидов [27]. Биомасса дрожжей, полученная культивированием микроорганизмов на промышленных отходах, может служить источником кормового белка и липидов [24, 26]. Кроме того, дрожжи *D. hansenii* способны продуцировать практически важные ферменты, полиолы, флавоноиды, рибофлавин, вещества, контролирующие развитие патогенных микроорганизмов и др. [23, 24, 26, 27]. Все это делает актуальным поиск новых областей применения биоконкомпозитов бактериальной целлюлозы с дрожжами *D. hansenii*.

Одной из перспективных областей применения дрожжей *D. hansenii* является энантиоселективный биокатализ. Обнаружено, что клетки ряда штаммов *D. hansenii* могут быть использованы в качестве энантиоселективных биокатализаторов для асимметрического восстановления прохиральных карбонилсодержащих соединений в энантиомерно чистые вторичные спирты [28–30], необходимые для синтеза хиральных биологически активных веществ, имеющих промышленное значение для фармацевтики и агрохимии [31, 32]. В том числе показано, что энантиоселективным восстановлением ацетофенона с помощью дрожжей *D. hansenii* может быть получен S-1-фенилэтанол – предшественник ряда фармакозначимых соединений [33, 34].

Целью настоящей работы являлось исследование возможности применения биоконкомпозита на основе бактериальной целлюлозы и дрожжей *D. hansenii* для интенсификации процесса получения энантиомерно чистого S-1-фенилэтанола.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовались дрожжевые штаммы *D. hansenii* Y-1889 и Y-1554, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, а также дрожжи *D. hansenii* Д-43-1 и бактерии *Komagataeibacter sucrofermentans* НЦ-12 из коллекции культур микроорганизмов кафедры биохимии и технологии микробиологических производств Уфимского государственного технического университета (г. Уфа, Россия). Идентификация штамма *K. sucrofermentans* НЦ-12 осуществлена на основе анализа последовательности 16S РНК в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (г. Москва, Россия). Штамм *D. hansenii* Д-43-1 идентифицирован на основании морфологических и физиолого-биохимических характеристик в соответствии с определителем дрожжей Курцмана [35].

Для исследования способности клеток дрожжей осуществлять восстановление ацетофенона получали биомассу микроорганизмов культивированием при  $25 \pm 1$  °С на агаризованной питательной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 10,0; дрожжевой автолизат – 5,0;

NaCl – 0,5;  $MgSO_4$  – 0,4;  $(NH_4)_2SO_4$  – 3,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0;  $K_2HPO_4$  – 0,1; агар микробиологический – 15,0. Биомассу дрожжей собирали с поверхности среды, суспендировали в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7), осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 3 мин и использовали в качестве биокатализатора.

Восстановление ацетофенона с помощью клеток дрожжей проводили при  $30 \pm 1$  °С в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7), содержащем 5% изопропанола (в качестве экзогенного восстановителя), 5 г/л ацетофенона (в качестве субстрата). Биомассу вносили в реакционную смесь в концентрации 20 или 40 г/л (АСВ<sup>1</sup>) в зависимости от цели эксперимента. При изучении влияния субстрата и экзогенного восстановителя на восстановление ацетофенона с помощью штамма *D. hansenii* Д-43-1 концентрацию кетона в буфере варьировали от 0 до 15 г/л, а содержание изопропанола изменяли от 0 до 30%.

Для текущего контроля концентрации ацетофенона и S-1-фенилэтанола пробы реакционной смеси центрифугировали при 10000 об/мин в течение 3 мин, дважды экстрагировали этилацетатом и осушали безводным сульфатом магния. Концентрацию субстрата и продукта в экстрактах определяли на хроматографе Chromatec-Crystal 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 °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 стандартных образцов использовали рацемическую смесь 1-фенилэтанола и S-(-)-1-фенилэтанол (Sigma-Aldrich, США).

Для выделения продукта реакции с целью анализа методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) реакционную массу центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Продукт трансформации, содержащийся в супернатанте, высаливали с помощью хлорида натрия и трехкратно экстрагировали равным объемом диэтилового эфира. Экстракт осушали безводным сульфатом магния, концентрировали на ротационном испарителе RV10 digital (IKA, Германия) и фракционировали на хроматографической колонке с силикагелем Merk 60 (0,063–0,200 мм) с использованием в качестве элюента смеси гексана и этилацетата (8:1). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре BrukerAM-300 (Bruker, 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 ( $\delta$  7,27 м.д.), в ЯМР  $^{13}C$  – средний сигнал  $CDCl_3$  ( $\delta$  77,00 м.д.). Спектральные характеристики S-1-фенилэтанола совпадают с литературными данными [36].

При исследовании роста дрожжей *D. hansenii* Д-43-1 на агаризованной питательной среде оценивали выход биомассы (в расчете на одну чашку Петри) и ее карбогидратную активность через 1, 2, 3 и 4 суток культивирования. Для оценки выхода биомассу, собранную с одной чашки Петри, суспендировали 5 мл 0,05 М

<sup>1</sup>АСВ – абсолютно сухое вещество.



фосфатного буфера (pH 7), после чего осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 3 мин. Количество собранной сырой биомассы оценивали гравиметрически. Карбонилредуктазную активность биомассы определяли по начальной скорости накопления S-1-фенилэтанола в процессе восстановления ацетофенона в оптимальных условиях (0,05 М фосфатный буфер (pH 7), 10% изопропанола, 5 г/л субстрата и 40 г/л биомассы (АСВ),  $30 \pm 1$  °C, 1 ч).

Гель-пленки бактериальной целлюлозы получали в процессе культивирования уксуснокислых бактерий *K. sucrofermentans* НЦ-12 [37] в статических условиях при 30 °C в колбах на 250 мл, содержащих 100 мл среды Хестрина – Шрамма [38] с 1% этанола, в течение 12 суток. По окончании культивирования гель-пленки полимера извлекали из культуральной жидкости, промывали дистиллированной водой и помещали в 0,5 М раствор NaOH для разрушения клеток продуцента. Разрушение клеток осуществляли при температуре 80 °C в течение 30 мин. Затем полимерные пленки промывали дистиллированной водой до достижения нейтрального Ph и использовали для иммобилизации дрожжей.

Иммобилизацию клеток дрожжей *D. hansenii* Д-43-1 на гель-пленках целлюлозы осуществляли адсорбционно-инкубационным методом. Для адсорбции клеток образцы пленок массой около 34 г помещали в колбы объемом 250 мл, содержащие 20 мл суспензии дрожжей в жидкой питательной среде, и перемешивали при 180 об/мин в течение 3 ч. Затем избыток среды декантировали и промывали пленки 50 мл стерильной воды (перемешивание при 180 об/мин в течение 15 мин). После декантирования воды пленки инкубировали в статических условиях течение 3 суток при 30 °C.

Содержание биомассы дрожжей в биокомпозиатах оценивали по концентрации клеточной массы в ферментативных гидролизатах, полученных путем гидролиза пленок целлюлолитическим препаратом Целлолюкс F. Концентрацию биомассы в гидролизатах определяли турбометрически при длине волны 540 нм на фотоэлектродетекторе КФК-2 (ПО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Культивирование дрожжей *D. hansenii* Д-43-1 в жидкой питательной среде с использованием биокомпозиата как иммобилизованного инокулята осуществляли в колбах на 250 мл, в которые вносили образцы гель-пленок композиата (около 34 г) и 30 мл питательной среды. В качестве контроля использовали среду того же объема, засеянную планктонным инокулятом до конечной концентрации биомассы 1 г/л (АСВ). Культивирование проводили при  $25 \pm 1$  °C, 220 об/мин. По окончании ферментации культуральную жидкость декантировали. Для повторной ферментации биокомпозиат заливали свежей порцией питательной среды. Рост дрожжей в жидких культурах оценивали турбометрически при длине волны 540 нм на фотоэлектродетекторе КФК-2.

Восстановление ацетофенона с помощью клеточной массы *D. hansenii* Д-43-1, полученной в процессах ферментации с использованием иммобилизованного инокулята, выделенной из культуральной жидкости, осуществляли в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7), содержащем 10% изопропанола, 5 г/л субстрата и 40 г/л биомассы (АСВ), при  $30 \pm 1$  °C в течение 1 ч. В экспериментах по исследованию возможности повторного использования

биокатализатора биомассу после окончания первого цикла трансформации отделяли от жидкой фракции реакционной смеси центрифугированием при 10000 об/мин в течение 5 мин. Для проведения последующего цикла трансформации биомассу суспендировали в свежем буфере, содержащем 5 г/л ацетофенона и 10% изопропанола.

Для восстановления ацетофенона с помощью образцов культуральной жидкости в них вносили ацетофенон и изопропанол в концентрации 5 г/л и 10% соответственно. Реакцию проводили при  $30 \pm 1$  °C. Выход S-1-фенилэтанола в реакции с культуральной жидкостью оценивали через 2 ч трансформации.

Трансформацию ацетофенона в присутствии биокомпозиата как иммобилизованного биокатализатора проводили при  $30 \pm 1$  °C при перемешивании на шейкере (180 об/мин) в течение 2 ч. Образцы биокомпозиата массой 5 г вносили в 10 мл 0,05 М фосфатного буфера (Ph 7), содержащего 5 г/л субстрата и 10% этанола. В экспериментах по поиску условий трансформации концентрацию субстрата и изопропанола увеличивали до 15 г/л и 30% соответственно.

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

#### **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Получение биомассы дрожжей и исследование способности восстанавливать ацетофенон. Асимметрическое восстановление прохиральных карбонилсодержащих соединений с помощью клеток микроорганизмов широко применяется в энантиоселективном биокатализе для получения энантиомерно чистых вторичных спиртов [32, 39, 40]. Восстановление катализируется внутриклеточными алкогольдегидрогеназами/карбонилредуктазами, использующими в качестве восстановителя NADH или NADPH [41, 42]. При использовании клеточных биокатализаторов процесс осуществляют в присутствии экзогенного восстановителя (глюкозы, изопропанола, этанола и др.), который используется для регенерации восстановленной формы коферментов [41].

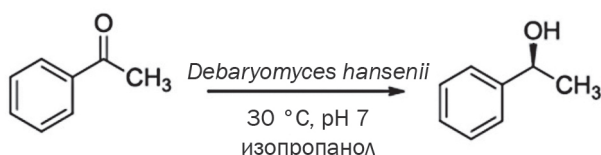
На первом этапе исследования с целью поиска перспективного энантиоселективного клеточного биокатализатора с карбонилредуктазной активностью исследовали способность трех штаммов *D. hansenii*, представленных в таблице, восстанавливать ацетофенон. Для трансформации использовали биомассу, полученную культивированием дрожжей на агаризованной питательной среде в течение 3 суток. В качестве экзогенного восстановителя использовали изопропанол, который может не только регенерировать кофермент, но также увеличивать растворимость гидрофобных субстратов в воде и повышать энантиоселективность клеточного биокатализатора – как полагают, за счет подавления активности сопутствующих ферментов, восстанавливающих субстрат с образованием антипода целевого энантиомера спирта [36, 42].

В результате исследования было обнаружено, что клетки двух штаммов дрожжей *D. hansenii* (Д-43-1 и ВКПМ Y-1889) восстанавливают ацетофенон в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7), содержащем 5 г/л субстрата и 10% изопропанола, в S-1-фенилэтанол с высокой энантиомерной чистотой (не менее 99% энантиомерного избытка), тогда как третий штамм (*D. hansenii* ВКПМ Y-1554) не работает в исследуемых условиях (см. таблицу, рис. 1).

Выход и энантиомерный избыток продукта  
 восстановления ацетофенона

Yield and enantiomeric excess of the acetophenone  
 reduction product

Штамм	Биомасса (АСВ), г/л	Время, ч	S-1-Фенилэтанол	
			выход, %	энантиомерный избыток, %
<i>Debaryomyces hansenii</i> ВКПМ Y-1889	40	1	35	99,6
		2	50	99,4
		4	57	99,7
<i>Debaryomyces hansenii</i> ВКПМ Y-1554	40	2	0	–
		4	0	–
<i>Debaryomyces hansenii</i> Δ-43-1	20	1	76	99,6
		2	86	99,9
		4	88	99,9
	40	1	83	99,9
		2	88	99,9
		4	89	99,9



**Рис. 1.** Восстановление ацетофенона в S-1-фенилэтанол с помощью клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii* Δ-43-1 и ВКПМ Y-1889 в присутствии изопропанола

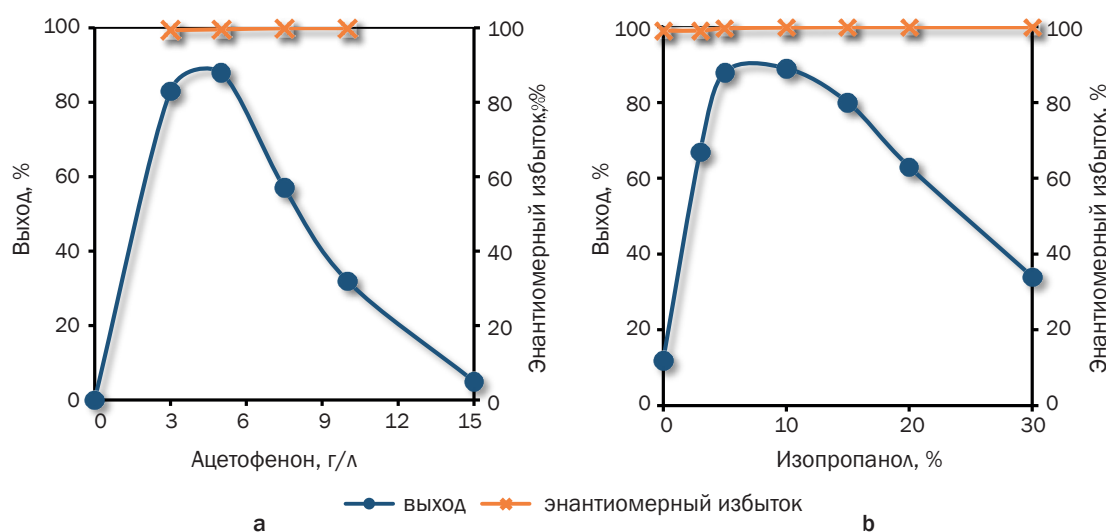
**Fig. 1.** Reduction of acetophenone to S-1-phenylethanol using yeast cells *Debaryomyces hansenii* Δ-43-1 and VKPM Y-1889 in the presence of isopropanol

Наиболее высокий выход S-1-фенилэтанола (более 80%) был получен при использовании штамма *D. hansenii* Δ-43-1. Причем для достижения этого результата потребовалось вдвое меньшее количества биомассы и более короткий промежуток времени по сравнению с использованием штамма *D. hansenii* ВКПМ Y-1889 (см. таблицу), в связи с чем штамм *D. hansenii* Δ-43-1 был выбран как перспективный для дальнейшего исследования.

Следует отметить, что в литературе имеется сообщение об одном штамме *D. hansenii* NCIM Y00468, который также проявлял карбонилредуктазную активность в присутствии изопропанола [43]. С помощью лиофилизированных и регидратированных клеток этого микроорганизма восстановление ацетофенона и его аналогов протекает энантиоселективно с образованием спиртов S-конфигурации. При восстановлении ацетофенона также, как и в случае использования *D. hansenii* Δ-43-1, удается получить S-1-фенилэтанол с энантиомерным избытком 99%, но с меньшим выходом (63%) и при более низкой концентрации субстрата.

При исследовании условий восстановления ацетофенона с помощью клеток штамма *D. hansenii* Δ-43-1 (20 г/л АСВ) было установлено, что оптимальной концентрацией субстрата является 5 г/л (рис. 2). В отсутствие изопропанола выход продукта через 2 ч составил не более 12% (см. рис. 2, б), что подтверждает участие изопропанола как экзогенного восстановителя в исследуемом процессе. Наибольший выход продукта был достигнут в области концентрации 5–10% изопропанола (см. рис. 2, б). Исследование энантиомерного состава продуктов восстановления показало, что независимо от концентрации субстрата или экзогенного восстановителя образуется S-1-фенилэтанол высокой энантиомерной чистоты (см. рис. 2).

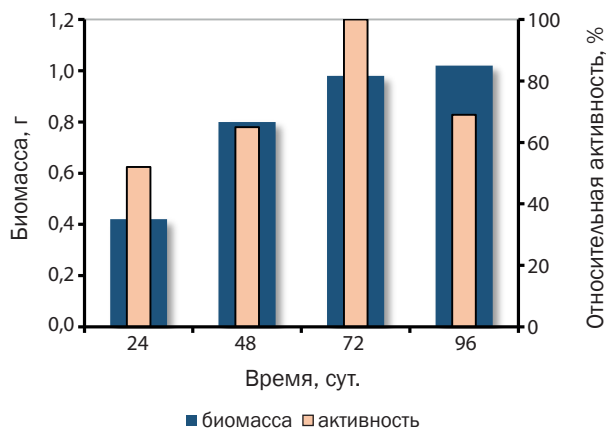
Установлено, что при культивировании дрожжей на агаризованной питательной среде наибольшая карбо-



**Рис. 2.** Зависимость выхода и энантиомерного избытка S-1-фенилэтанола от начальной концентрации субстрата (а) и экзогенного восстановителя (б) в процессе восстановления ацетофенона в присутствии биомассы дрожжей *Debaryomyces hansenii* Δ-43-1

**Fig. 2.** Yield and enantiomeric excess of S-1-phenylethanol versus the initial concentration of substrate (a) and exogenous reducing agent (b) in the process of acetophenone reduction in the presence of yeast biomass *Debaryomyces hansenii* Δ-43-1

нилредуктазная активность биомассы *D. hansenii* Д-43-1 достигается через 72 ч, что соответствует началу стационарной фазы роста культуры (рис. 3). Дальнейшее увеличение продолжительности культивирования до 96 ч приводит к снижению активности биомассы почти на 30%.



**Рис. 3.** Выход и карбонилредуктазная активность биомассы *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 в зависимости от продолжительности роста на агаризованной питательной среде

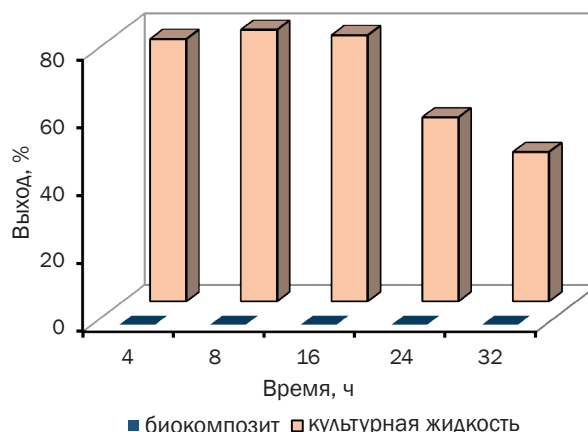
**Fig. 3.** Yield and carbonyl reductase activity of *Debaryomyces hansenii* D-43-1 biomass depending on the duration of growth on an agarized nutrient medium

Получение биокомпозита и исследование возможности его использования в качестве биокатализатора для восстановления ацетофенона. На втором этапе работы клетки *D. hansenii* Д-43-1 были иммобилизованы на гелевых пленках бактериальной целлюлозы. Гель-пленки получали с помощью бактериального штамма *K. sucrofermentans* НЦ-12 [37], способного продуцировать целлюлозу при культивировании на среде Хестрина – Шрамма [38], содержащей 1% этанола. В результате культивирования бактерий в статических условиях были получены гель-пленки со средней массой 34 г, в которых содержание целлюлозы (АСВ) составило около 1,5%. Иммобилизацию дрожжей осуществляли адсорбционно-инкубационным методом. При этом инкубирование клеток дрожжей, адсорбированных в течение 3 ч на носителе, пропитанном питательными компонентами, осуществляли в течение 72 ч по аналогии с культивированием микроорганизмов на агаризованной среде (см. рис. 3). В результате иммобилизации были получены образцы биокомпозитов, содержащие около 70 мг биомассы дрожжей (АСВ) в 1 г сырого полимера.

Далее образцы полученного биокомпозита были разрезаны на фрагменты и использованы для исследования возможности их применения в качестве биокатализатора для восстановления ацетофенона. Биокатализатор массой 5 г вносили в буфер объемом 10 мл, содержащий оптимальные концентрации субстрата и восстановителя. Однако образование продукта восстановления ацетофенона в этих условиях не было обнаружено. Варьирование концентрациями субстрата (от 7 до 15 г/л), экзогенного восстановителя (от 15 до 30%), а также двукратное увеличение содержания биокомпозита тоже не привели к успеху.

Инкубирование биокомпозита в жидкой питательной среде. Согласно современным представлениям, иммобилизованные клетки микроорганизмов находятся в особом состоянии, отличном от стационарной фазы роста свободных клеток [44]. Более того, отмечается, что в результате иммобилизации клеток может происходить изменение ферментативной активности, появление новых функциональных белков и метаболитов, например, у иммобилизованных клеток ряда дрожжей было отмечено увеличение концентрации ферментов, участвующих в анаэробных процессах, гликолизе [44]. Можно ожидать, что клетки *D. hansenii* Д-43-1, иммобилизованные на бактериальной целлюлозе, также могут биохимически отличаться от клеток стационарной фазы роста, выращенных на поверхности агаризованной среды, в том числе отсутствием карбонилредуктазной активности.

С целью изменения биохимических характеристик клеток, иммобилизованных на целлюлозе, образцы биокомпозита были помещены в свежую питательную среду и инкубированы при  $25 \pm 2$  °C и 220 об/мин в течение 32 ч. В процессе культивирования образцы биокомпозита периодически отбирали и тестировали на способность осуществлять восстановление ацетофенона. Однако ни один из образцов не проявил карбонилредуктазную активность (рис. 4).



**Рис. 4.** Выход S-1-фенилэтанола при использовании в качестве биокатализатора образцов культуральной жидкости и биокомпозита, полученных при различной продолжительности ферментации

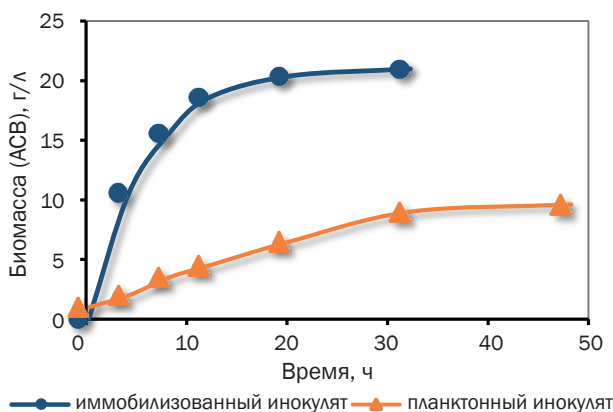
**Fig. 4.** Yield of S-1-phenylethanol when culture liquid and biocomposite samples obtained with different fermentation duration used as a biocatalyst

Вместе с тем было обнаружено, что в процессе культивирования дрожжевые клетки могут выходить из гель-пленки целлюлозы в питательную среду и проявлять в ней карбонилредуктазную активность. Добавление ацетофенона и изопропанола (в концентрации 5 г/л и 10% соответственно) к 1 мл культуральной жидкости и последующее инкубирование при 30 °C позволило обнаружить накопление S-1-фенилэтанола в реакционной смеси. Наибольший выход продукта (около 80%) был получен с помощью образцов культуральной жидкости, отобранных через 8 и 16 ч ферментации (см. рис. 4). Дальнейшее увеличение продолжительности культивирования сопровождалось снижением восстановительных свойств культуральной жидкости. Выход продукта



S-1-фенилэтанола, полученного с помощью образца культуральной жидкости, взятого через 32 ч ферментации, не превышал 44%.

Установлено, что в процессе культивирования биоконцентрация концентрации биомассы в культуральной жидкости увеличивается до 21 г/л (АСВ) (рис. 5). Такое существенное увеличение невозможно объяснить только лишь десорбцией дрожжевых клеток из геле-пленки целлюлозы. Очевидно, вышедшие из биоконцентра клетки способны к активному росту в жидкой питательной среде, что позволяет рассматривать биоконцентра как иммобилизованный инокулят для получения свободных клеток штамма *D. hansenii* Д-43-1.



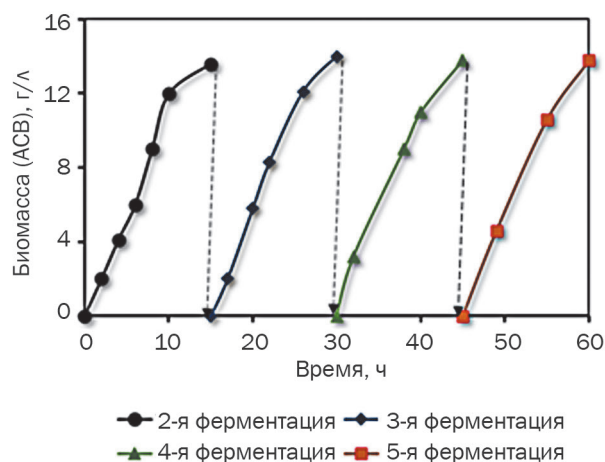
**Рис. 5.** Накопление биомассы *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 при использовании иммобилизованного и планктонного инокулята

**Fig. 5.** Accumulation of *Debaryomyces hansenii* D-43-1 biomass using an immobilized and planktonic inoculum

В работе [45] показано, что иммобилизованный инокулят, созданный путем иммобилизации в криогеле поливинилового спирта клеток *Chlorella vulgaris*, позволяет интенсифицировать процесс получения биомассы свободных клеток при культивировании микроводорослей в миксотрофных условиях. Увеличение исходной концентрации иммобилизованных клеток, вводимых в среду вместе с носителем, приводит к значительному повышению скорости накопления потомственных свободных клеток в среде. При использовании иммобилизованного инокулята в оптимальной концентрации этот показатель был почти в 4 раза выше, чем при применении в качестве посевного материала незакрепленных клеток (10% от объема среды).

Сравнение роста дрожжей *D. hansenii* Д-43-1 при культивировании в присутствии биоконцентра с контрольной ферментацией, в которой в качестве посевного материала использовалась суспензия свободных клеток в концентрации 1 г/л (АСВ), показало, что в случае иммобилизованного инокулята накапливается в 3 раза больше биомассы, нежели в контроле с планктонным инокулятом (см. рис. 5).

Обнаружено, что иммобилизованный инокулят можно применять для получения биомассы многократно (рис. 6). В повторных ферментациях в течение 15-часового культивирования стабильно достигается высокий выход биомассы (около 13 г/л), который почти в 2 раза превышает уровень, достигнутый за тот же промежуток времени при использовании планктонного посевного материала (см. рис. 5 и 6).

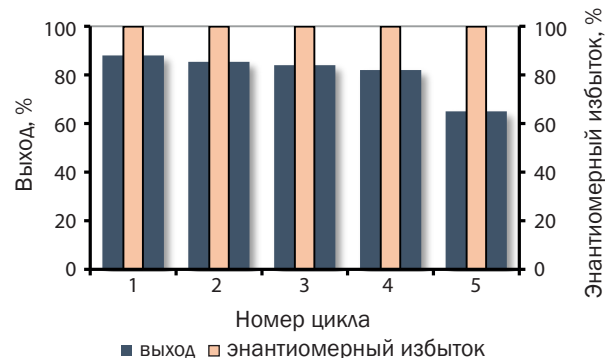


**Рис. 6.** Рост дрожжей *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 в повторных ферментациях с использованием иммобилизованного инокулята (пунктирными стрелками отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе свежей средой)

**Fig. 6.** Growth of yeast *Debaryomyces hansenii* D-43-1 in repeated fermentations using an immobilized inoculum (the dotted arrows indicate the time of replacement of the culture liquid in the reactor with a fresh medium)

Исследование способности планктонной биомассы, полученной с помощью иммобилизованного инокулята, восстанавливать ацетофенон. Для оценки пригодности биомассы свободных клеток дрожжей, полученных в результате культивирования иммобилизованного инокулята, для восстановления ацетофенона в S-1-фенилэтанола была осуществлена 15-часовая ферментация, обеспечивающая высокую карбонилредуктазную активность культуральной жидкости (см. рис. 4). Затем отмытая от среды биомасса была испытана на способность восстанавливать ацетофенон в оптимальных условиях.

В результате исследования было установлено, что полученная биомасса является эффективным энантио-селективным биокатализатором и позволяет получать S-1-фенилэтанола высокой энантиомерной чистоты (99,9% энантиомерного избытка) с выходом 88% (рис. 7, цикл 1).

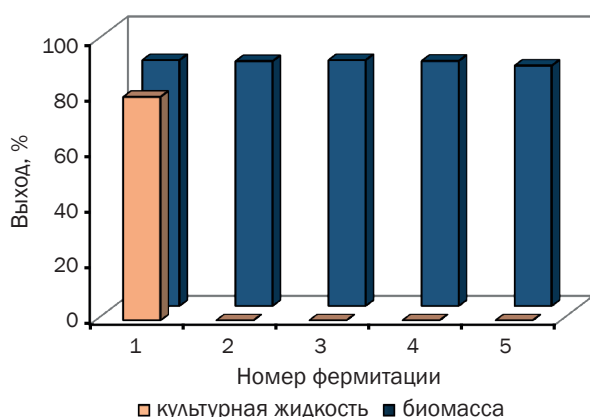


**Рис. 7.** Выход и энантиомерная чистота S-1-фенилэтанола при многократном использовании в качестве биокатализатора биомассы дрожжей, полученной с помощью иммобилизованного инокулята

**Fig. 7.** Yield and enantiomeric purity of S-1-phenylethanol with repeated use of yeast biomass obtained using an immobilized inoculum as a biocatalyst

Биокатализатор в концентрации 40 г/л (АСВ) может использоваться повторно для восстановления ацетофенона в энантиомерно чистый S-1-фенилэтанол в течение четырех циклов трансформации без существенного снижения выхода продукта (см. рис. 7). Однако в пятом цикле выход продукта снижается до 65%, что ограничивает возможность дальнейшего эффективного использования биокатализатора.

При исследовании биокаталитических свойств образцов биомассы, выделенных из культуральных жидкостей повторных ферментаций, обнаружено, что все они проявляют карбонилредуктазную активность и позволяют получать S-1-фенилэтанол высокой энантиомерной чистоты (не менее 99 % энантиомерного избытка) практически с таким же выходом, как после первой ферментации (рис. 8).



**Рис. 8.** Выход S-1-фенилэтанола в процессе восстановления ацетофенона с помощью образцов культуральной жидкости и биомассы, полученных при многократном использовании иммобилизованного инокулята

**Fig. 8.** Yield of S-1-phenylethanol in the process of acetophenone reduction using culture fluid and biomass samples obtained by repeated use of an immobilized inoculum

Вместе с тем было обнаружено, что, если биомассу не выделять из ростовой среды и использовать в качестве биокатализатора саму культуральную жидкость, не всегда можно осуществить восстановление ацетофенона. Только в случае образца культуральной жидкости из первой ферментации образуется S-1-фенилэтанол с высоким выходом 81% (см. рис. 8). При использовании образцов культуральной жидкости, полученных в повторных фер-

ментациях, реакция восстановления ацетофенона не протекала, несмотря на присутствие в них дрожжевых клеток с карбонилредуктазной активностью. Это указывает на наличие в культуральных жидкостях, полученных во второй и последующих ферментациях, ингибиторов карбонилредуктазной активности клеток. Возможно, что накоплением таких ингибиторов в гель-пленке целлюлозы в процессе иммобилизации дрожжей объясняется отсутствие карбонилредуктазной активности у биокомпозиата. Можно также полагать, что ингибиторы, образующиеся в пленке, выделяются из нее в культуральную жидкость во время ферментации и подавляют активность свободных клеток. В таком случае предотвращение их образования или удаление *in situ* может привести к появлению карбонилредуктазной активности у биокомпозиата.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, продемонстрирована перспективность применения бактериальной целлюлозы на стадии подготовки клеточного биокатализатора для интенсификации процессов получения энантиомерно чистых спиртов асимметрическим восстановлением прохиральных карбонилсодержащих предшественников.

На примере дрожжей *D. hansenii* Д-43-1, клетки которых способны энантиоселективно восстанавливать ацетофенон в S-1-фенилэтанол в присутствии изопропанола, показано, что бактериальная целлюлоза может быть использована в качестве матрицы для получения иммобилизованного инокулята. Применение такого инокулята позволяет накапливать энзиматически активную биомассу микроорганизмов с карбонилредуктазной активностью более эффективно, чем при использовании планктонного посевного материала. Иммобилизованный инокулят может быть использован многократно, что открывает перспективу для дальнейшей разработки способа получения энзиматически активной биомассы *D. hansenii* Д-43-1 в непрерывном режиме.

Биомасса свободных клеток, полученная с применением иммобилизованного инокулята, после выделения из культуральной жидкости способна восстанавливать ацетофенон в энантиомерно чистый S-1-фенилэтанол (не менее 99% энантиомерного избытка) с выходом 88%. На примере биомассы, полученной после первой ферментации, показано, что она может быть использована повторно в течение четырех циклов без существенного снижения выхода продукта. Только в пятом цикле выход продукта снижается до 65%.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Choi S.M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han S.S. Bacterial cellulose and its applications // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 6. P. 1080. DOI: 10.3390/polym14061080.
2. Navya P.V., Gayathri V., Samanta D., Sampath S. Bacterial cellulose: a promising biopolymer with interesting properties and applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Vol. 220. P. 435–461. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.056.
3. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kuzmenko T.P., Kurgaeva I.V., Revin V.D., et al. Bacterial cellulose-based polymer nanocomposites: a review // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 21. P. 4670. DOI: 10.3390/polym14214670.
4. Рогова Е.А., Алашкевич Ю.Д., Кожухов В.А.,

Лапин И.Р., Киселев Е.Г. Состояние и перспективы совершенствования способов получения и использования бактериальной целлюлозы (обзор) // *Химия растительного сырья*. 2022. N 4. С. 27–46. DOI: 10.14258/jcprm.20220411373. EDN: ABGQJV.

5. Lu Y., Mehling M., Huan S., Bai L., Rojas O.J. Biofabrication with microbial cellulose: from bioadaptive designs to living materials // *Chemical Society Reviews*. 2024. Vol. 53, no. 14. P. 7363–7391. DOI: 10.1039/d3cs00641g.

6. Hornung M., Ludwig M., Gerrard A.M., Schmauder H.-P. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (part 1) // *Engineering in Life Sci-*



- ences. 2006. Vol. 6, no. 6. P. 537–545. DOI: 10.1002/elsc.200620162.
- 7.** Zywicka A., Banach A., Junka A.F., Drozd R., Fijałkowski K. Bacterial cellulose as a support for yeast immobilization – correlation between carrier properties and process efficiency // *Journal of Biotechnology*. 2019. Vol. 291. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.010.
- 8.** Gilbert C., Tang T.-C., Ott W., Dorr B.A., Shaw W.M., Sun G.L., et al. Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures // *Nature Materials*. 2021. Vol. 20. P. 691–700. DOI: 10.1038/s41563-020-00857-5.
- 9.** Savitskaya I.S., Shokatayeva D.H., Kistaubayeva A.S., Ignatova L.V., Digel I.E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells // *Heliyon*. 2019. Vol. 5, no. 10. P. e02592. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02592.
- 10.** Atta O.M., Manan S., Ahmed A.A.Q., Awa M.F., Ul-Islam M., Subhan F., et al. Development and characterization of yeast-incorporated antimicrobial cellulose biofilms for edible food packaging application // *Polymers*. 2021. Vol. 13, no. 14. P. 2310. DOI: 10.3390/polym13142310.
- 11.** Fijałkowski K., Peitler D., Rakoczy R., Żywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution // *LWT – Food Science and Technology*. 2016. Vol. 68. P. 322–328. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.038.
- 12.** Zhao C., Wang G., Sun M., Cai Z., Yin Z., Cai Y. Bacterial cellulose immobilized *S. cerevisiae* as microbial sensor for rapid BOD detection // *Fibers and Polymers*. 2021. Vol. 22. P. 1208–1217. DOI: 10.1007/s12221-021-0650-5.
- 13.** Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Китова А.Е., Быков А.Г., Мачулин А.В., Колесов В.В. [и др.]. Бактериальная целлюлоза как матрица для микроорганизмов в биоэлектродокаталитических системах // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. N 4. С. 388–399. DOI: 10.31857/S0555109922040158. EDN: GQREUZ.
- 14.** Xiao J., Chen Y., Xue M., Ding R., Kang Y., Tremblay P.-L., et al. Fast-growing cyanobacteria bio-embedded into bacterial cellulose for toxic metal bioremediation // *Carbohydrate Polymers*. 2022. Vol. 295. P. 119881. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119881.
- 15.** Колобова С.А., Скорняков А.Н., Петухова Н.И., Алексеева В.Э., Халимова Л.Х., Зорин В.В. Окисление пирокатехина с помощью биокомпозита на основе спорообразующих бактерий и бактериальной целлюлозы // *Башкирский химический журнал*. 2023. Т. 30. N 4. С. 48–55. DOI: 10.17122/bcj-2023-4-48-55. EDN: CZIHIA.
- 16.** Lee S.H., Ahn G., Shin W.-R., Choi J.-W., Kim Y.-H., Ahn J.-Y. Synergistic outcomes of *Chlorella*-bacterial cellulose based hydrogel as an ethylene scavenger // *Carbohydrate Polymers*. 2023. Vol. 321. P. 121256. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121256.
- 17.** Колобова С.А., Назмутдинов Д.З., Петухова Н.И., Халимова Л.Х. Бактериальная целлюлоза – перспективный носитель для иммобилизации микроорганизмов – деструкторов фенола // *Башкирский химический журнал*. 2019. Т. 26. N 1. С. 105–111. DOI: 10.17122/bcj-2019-1-105-111. EDN: ZIDSVI.
- 18.** Žur J., Piński A., Michalska J., Hupert-Kocurek K., Nowak A., Wojcieszynska D., et al. A whole-cell immobilization system on bacterial cellulose for the paracetamol-degrading *Pseudomonas moorei* KB4 strain // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2020. Vol. 149. P. 104919. DOI: 10.1016/j.ibiod.2020.104919.
- 19.** Yao W., Wu X., Zhu J., Sun B., Zhang Y.Y., Miller C. Bacterial cellulose membrane – a new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation // *Process Biochemistry*. 2011. Vol. 46, no. 10. P. 2054–2058. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.07.006.
- 20.** Zywicka A., Junka A., Ciecholewska-Juško D., Migdał P., Czajkowska J., Fijałkowski K. Significant enhancement of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* immobilized in bacterial cellulose-based carrier // *Journal of Biotechnology*. 2020. Vol. 321. P. 13–22. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.014.
- 21.** Wei J., Zhang X., Ai S., Huang Y., Yang X., Mei Y., et al. The effective astaxanthin productivities of immobilized *Haematococcus pluvialis* with bacterial cellulose // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 344. P. 126317. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126317.
- 22.** Назмутдинов Д.З., Порошина Н.Н., Петухова Н.И. *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 – новый галотолерантный деструктор фенола // *Башкирский химический журнал*. 2018. Т. 25. N 2. С. 57–63. DOI: 10.17122/bcj-2018-2-57-63. EDN: LYBVTN.
- 23.** Prista C., Michán C., Miranda I.M., Ramos J. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts // *Yeast*. 2016. Vol. 33, no. 10. P. 523–533. DOI: 10.1002/yea.3177.
- 24.** Yaguchi A., Rives D., Blenner M. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance // *AIMS Microbiology*. 2017. Vol. 3, no. 2. P. 227–247. DOI: 10.3934/microbiol.2017.2.227.
- 25.** Пономарева О.Н., Афонина Е.Л., Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Арляпов В.А., Алферов В.А. [и др.]. Дрожжи *Debaryomyces hansenii* в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора // *Биотехнология*. 2017. Т. 33. N 4. С. 44–53. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-44-53. EDN: ZEULVX.
- 26.** Donzella S., Capusoni C., Pellegrino L., Compagno C. Bioprocesses with reduced ecological footprint by marine *Debaryomyces hansenii* strain for potential applications in circular economy // *Journal of Fungi*. 2021. Vol. 7, no. 12. P. 1028. DOI: 10.3390/jof7121028.
- 27.** Estrada M., Navarrete C., Moller S., Procentese A., Martínez J.L. Utilization of salt-rich byproducts from the dairy industry as feedstock for recombinant protein production by *Debaryomyces hansenii* // *Microbial Biotechnology*. 2023. Vol. 16, no. 2. P. 404–417. DOI: 10.1111/1751-7915.14179.
- 28.** Borowiecki P., Włoczewska M., Ochal Z. Asymmetric reduction of 1-(benzoazol-2-ylsulfanyl)propan-2-ones using whole cells of *Mortierella isabellina*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* and *Zygosaccharomyces rouxii* // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014. Vol. 109. P. 9–16. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.07.015.
- 29.** Şahin E. *Debaryomyces hansenii* as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2017. Vol. 35, no. 5. P. 363–371. DOI: 10.1080/10242422.2017.1348500.
- 30.** Chlipała P., Janeczko T., Mazur M. Bioreduction of 4'-hydroxychalcone in deep eutectic solvents: optimization and efficacy with various yeast strains // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25, no. 13. P. 7152. DOI: 10.3390/ijms25137152.
- 31.** Petukhova N.I., Zorin V.V., Sakaeva A.R., Myty-

agina A.V., Nurieva E.R., Vydrina V.A., et al. Enantioselective bioreduction of 5-hexen-2-one in directional synthesis of insect pheromones // Russian Journal of Applied Chemistry. 2022. Vol. 95. P. 442–450. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1070427222030156>.

**32.** Simić S., Zukić E., Schmermund L., Faber K., Winkler C.K., Kroutil W. Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods // Chemical Reviews. 2022. Vol. 122, no. 1. P. 1052–1126. DOI: [10.1021/acs.chemrev.1c00574](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00574).

**33.** Vieira G., de Freitas Araujo D., Lemos T., de Mattos M., de Oliveira M., Melo V., et al. *Candida tropicalis* CE017: a new Brazilian enzymatic source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones // Journal of the Brazilian Chemical Society. 2010. Vol. 21, no. 8. P. 1509–1516. DOI: [10.1590/S0103-50532010000800015](https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000800015).

**34.** Шейко Е.А., Медникова Е.Э., Воробьева Т.Е., Чанышева А.Р. Исследование условий энантиоселективного биовосстановления ацетофенона в (S)-(-)-1-фенилэтанол // Башкирский химический журнал. 2018. Т. 25. N 1. С. 55–58. DOI: [10.17122/bcj-2018-1-55-58](https://doi.org/10.17122/bcj-2018-1-55-58). EDN: QOIUPB.

**35.** The yeasts: a taxonomic study / eds C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. Amsterdam: Elsevier, 2011. 2354 p.

**36.** Шакиров А.Н., Петухова Н.И., Зорин В.В. Энантиоселективное восстановление карбонилсодержащих соединений с помощью дрожжей *Pichia fermentans* 87-9 // Башкирский химический журнал. 2013. Т. 20. N 4. С. 59–63. EDN: RVLKIH.

**37.** Петухова Н.И., Колобова С.А., Назмутдинова Р.Р., Зорин В.В. Синтез целлюлозы изолятами уксуснокислых бактерий из «чайного гриба» // Башкирский химический журнал. 2016. Т. 23. N 1. С. 7–13. EDN: VSPLVX.

**38.** Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // Biochemical Journal. 1954. Vol. 58, no. 2. P. 345–352. DOI: [10.1042/bj0580345](https://doi.org/10.1042/bj0580345).

**39.** Patel R.N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis // Coordination Chemistry Reviews. 2008. Vol. 252, no. 5–7. P. 659–701. DOI: [10.1016/j.ccr.2007.10.031](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.031).

**40.** Goldberg K., Schroer K., Lütz 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. P. 249–255. DOI: [10.1007/s00253-007-1005-x](https://doi.org/10.1007/s00253-007-1005-x).

**41.** Kratzer R., Woodley J.M., Nidetzky B. Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions // Biotechnology Advances. 2015. Vol. 33, no. 8. P. 1641–1652. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2015.08.006](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.006).

**42.** Митягина А.В., Рахманов Т.Р., Петухова Н.И., Зорин В.В. Энантиоселективное восстановление карбонилсодержащих соединений с помощью клеток *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-1161 // Башкирский химический журнал. 2022. Т. 29. N 1. С. 29–36. DOI: [10.17122/bcj202212936](https://doi.org/10.17122/bcj202212936). EDN: JIQGSM.

**43.** Erdélyi B., Szabó A., Seres G., Birincsik L., Ivanics J., Szatzker G., et al. Stereoselective production of (S)-1-aryl- and 1-arylethanol by freshly harvested and lyophilized yeast cells // Tetrahedron: Asymmetry. 2006. Vol. 17, no 2. P. 268–274. DOI: [10.1016/j.tetasy.2005.12.025](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.12.025).

**44.** Андрушина В.А., Балабанова Т.В., Беклемишев А.Б., Варфоломеев С.Д., Водякова М.А., Демаков В.А. [и др.]. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. М.: Издательский центр РИОР, 2018. 500 с. EDN: YOSKMP.

**45.** Никольская А.Б., Холстов А.В., Лягин И.В., Мамедова Ф., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Имобилизованные клетки *Chlorella vulgaris* для решения задач альтернативной энергетики и экологии // Альтернативная энергетика и экология. 2012. N 4. С. 95–100. EDN: PAVVTN.

## REFERENCES

**1.** Choi S.M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han S.S. Bacterial cellulose and its applications. *Polymers*. 2022;14(6):1080. DOI: [10.3390/polym14061080](https://doi.org/10.3390/polym14061080).

**2.** Navya P.V., Gayathri V., Samanta D., Sampath S. Bacterial cellulose: a promising biopolymer with interesting properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;220:435–461. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2022.08.056](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.056).

**3.** Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kuzmenko T.P., Kurgaeva I.V., Revin V.D., et al. Bacterial cellulose-based polymer nanocomposites: a review. *Polymers*. 2022;14(21):4670. DOI: [10.3390/polym14214670](https://doi.org/10.3390/polym14214670).

**4.** Rogova E.A., Alashkevich Yu.D., Kozhukhov V.A., Lapin I.R., Kiselyov E.G. The state and prospects of improving the methods of obtaining and using bacterial cellulose (review). *Chemistry of plant raw materials*. 2022;4:27–46. (In Russian). DOI: [10.14258/jcprm.20220411373](https://doi.org/10.14258/jcprm.20220411373). EDN: ABGQJV.

**5.** Lu Y., Mehling M., Huan S., Bai L., Rojas O.J. Biofabrication with microbial cellulose: from bioadaptive designs to living materials. *Chemical Society Reviews*. 2024;53(14):7363–7391. DOI: [10.1039/d3cs00641g](https://doi.org/10.1039/d3cs00641g).

**6.** Hornung M., Ludwig M., Gerrard A.M., Schmauder H.-P. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: evaluation of substrate mass transfer influences

on the bioreaction (part 1). *Engineering in Life Sciences*. 2006;6(6):537–545. DOI: [10.1002/elsc.200620162](https://doi.org/10.1002/elsc.200620162).

**7.** Zywicka A., Banach A., Junka A.F., Drozd R., Fijałkowski K. Bacterial cellulose as a support for yeast immobilization – correlation between carrier properties and process efficiency. *Journal of Biotechnology*. 2019;291:1–6. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2018.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.12.010).

**8.** Gilbert C., Tang T.-C., Ott W., Dorr B.A., Shaw W.M., Sun G.L., et al. Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures. *Nature Materials*. 2021;20:691–700. DOI: [10.1038/s41563-020-00857-5](https://doi.org/10.1038/s41563-020-00857-5).

**9.** Savitskaya I.S., Shokatayeva D.H., Kistaubayeva A.S., Ignatova L.V., Digel I.E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells. *Heliyon*. 2019;5(10):e02592. DOI: [10.1016/j.heliyon.2019.e02592](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02592).

**10.** Atta O.M., Manan S., Ahmed A.A.Q., Awa M.F., Ul-Islam M., Subhan F., et al. Development and characterization of yeast-incorporated antimicrobial cellulose biofilms for edible food packaging application. *Polymers*. 2021;13(14):2310. DOI: [10.3390/polym13142310](https://doi.org/10.3390/polym13142310).

**11.** Fijałkowski K., Peitler D., Rakoczy R., Żywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized



- in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *LWT – Food Science and Technology*. 2016;68:322-328. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.038.
- 12.** Zhao C., Wang G., Sun M., Cai Z., Yin Z., Cai Y. Bacterial cellulose immobilized *S. cerevisiae* as microbial sensor for rapid BOD detection. *Fibers and Polymers*. 2021;22:1208-1217. DOI: 10.1007/s12221-021-0650-5.
- 13.** Tarasov S.E., Plekhanova Yu.V., Kitova A.E., Bykov A.G., Machulin A.V., Kolesov V.V., et al. Bacterial cellulose as a matrix for microorganisms in bioelectrocatalytic systems. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2022;58(4):388-399. (In Russian). DOI: 10.31857/S0555109922040158. EDN: GQREUZ.
- 14.** Xiao J., Chen Y., Xue M., Ding R., Kang Y., Tremblay P.-L., et al. Fast-growing cyanobacteria bio-embedded into bacterial cellulose for toxic metal bioremediation. *Carbohydrate Polymers*. 2022;295:119881. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119881.
- 15.** Kolobova S.A., Skorniakov A.N., Petukhova N.I., Alekseeva V.E., Khalimova L.Kh., Zorin V.V. Catechol oxidation by the biocomposite based on bacterial cellulose and spore-forming bacteria. *Bashkirian Chemical Journal*. 2023;30(4):48-55. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj-2023-4-48-55. EDN: CZIHIA.
- 16.** Lee S.H., Ahn G., Shin W.-R., Choi J.-W., Kim Y.-H., Ahn J.-Y. Synergistic outcomes of *Chlorella*-bacterial cellulose based hydrogel as an ethylene scavenger. *Carbohydrate Polymers*. 2023;321:121256. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121256.
- 17.** Kolobova S.A., Nazmutdinov D.Z., Petukhova N.I., Khalimova L.Kh. Bacterial cellulose – promising carrier for immobilization of phenol-destructing microorganisms. *Bashkirian Chemical Journal*. 2019;26(1):105-111. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj-2019-1-105-111. EDN: ZIDSVI.
- 18.** Żur J., Piński A., Michalska J., Hupert-Kocurek K., Nowak A., Wojcieszńska D., et al. A whole-cell immobilization system on bacterial cellulose for the paracetamol-degrading *Pseudomonas moorei* KB4 strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2020;149:104919. DOI: 10.1016/j.ibiod.2020.104919.
- 19.** Yao W., Wu X., Zhu J., Sun B., Zhang Y.Y., Miller C. Bacterial cellulose membrane – a new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation. *Process Biochemistry*. 2011;46(10):2054-2058. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.07.006.
- 20.** Zywicka A., Junka A., Ciecholewska-Juško D., Migdał P., Czajkowska J., Fijałkowski K. Significant enhancement of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* immobilized in bacterial cellulose-based carrier. *Journal of Biotechnology*. 2020;321:13-22. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.014.
- 21.** Wei J., Zhang X., Ai S., Huang Y., Yang X., Mei Y., et al. The effective astaxanthin productivities of immobilized *Haematococcus pluvialis* with bacterial cellulose. *Bioresource Technology*. 2022;344:126317. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126317.
- 22.** Nazmutdinov D.Z., Poroshina N.N., Petukhova N.I. *Debaryomyces hansenii* d-43-1 - new halotolerant phenol destructor. *Bashkirian Chemical Journal*. 2018;25(2):57-63. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj-2018-2-57-63. EDN: LYBVTN.
- 23.** Prista C., Michán C., Miranda I.M., Ramos J. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*. 2016;33(10):523-533. DOI: 10.1002/yea.3177.
- 24.** Yaguchi A., Rives D., Blenner M. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance. *AIMS Microbiology*. 2017;3(2):227-247. DOI: 10.3934/microbiol.2017.2.227.
- 25.** Ponamareva O.N., Afonina E.L., Kamanina O.A., Lavrova D.G., Arliapov V.A., Alferov V.A., et al. Yeast *Debaryomyces hansenii* in ormosil shells as a heterogeneous biocatalyst. *Biotechnologiya*. 2017;33(4):44-53. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-44-53. EDN: ZEULVX.
- 26.** Donzella S., Capusoni C., Pellegrino L., Compagno C. Bioprocesses with reduced ecological footprint by marine *Debaryomyces hansenii* strain for potential applications in circular economy. *Journal of Fungi*. 2021;7(12):1028. DOI: 10.3390/jof7121028.
- 27.** Estrada M., Navarrete C., Moller S., Procentese A., Martínez J.L. Utilization of salt-rich byproducts from the dairy industry as feedstock for recombinant protein production by *Debaryomyces hansenii*. *Microbial Biotechnology*. 2023;16(2):404-417. DOI: 10.1111/1751-7915.14179.
- 28.** Borowiecki P., Włoczewska M., Ochół Z. Asymmetric reduction of 1-(benzoazol-2-ylsulfanyl)propan-2-one using whole cells of *Mortierella isabellina*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014;109:9-16. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.07.015.
- 29.** Şahin E. *Debaryomyces hansenii* as a new biocatalyst in the asymmetric reduction of substituted acetophenones. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2017;35(5):363-371. DOI: 10.1080/10242422.2017.1348500.
- 30.** Chlipała P., Janeczko T., Mazur M. Bioreduction of 4'-hydroxychalcone in deep eutectic solvents: optimization and efficacy with various yeast strains. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(13):7152. DOI: 10.3390/ijms25137152.
- 31.** Petukhova N.I., Zorin V.V., Sakaeva A.R., Mytyagina A.V., Nurieva E.R., Vydrina V.A., et al. Enantioselective bioreduction of 5-hexen-2-one in directional synthesis of insect pheromones. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2022;95:442-450. DOI: <https://doi.org/10.1134/s1070427222030156>.
- 32.** Simić S., Zukić E., Schmermund L., Faber K., Winkler C.K., Kroutil W. Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods. *Chemical Reviews*. 2022;122(1):1052-1126. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00574.
- 33.** Vieira G., de Freitas Araujo D., Lemos T., de Mattos M., de Oliveira M., Melo V., et al. *Candida tropicalis* CE017: a new Brazilian enzymatic source for the bioreduction of aromatic prochiral ketones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2010;21(8):1509-1516. DOI: 10.1590/S0103-50532010000800015.
- 34.** Sheiko E.A., Mednikova E.E., Vorobyeva T.E., Chanysheva A.R. Investigation of enantioselective bioreduction conditions of acetophenone to (S)-(-)-1-phenylethanol. *Bashkirian Chemical Journal*. 2018;25(1):55-58. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj-2018-1-55-58. EDN: QOIUPB.
- 35.** Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier; 2011, 2354 p.
- 36.** Shakirov A.N., Petukhova N.I., Zorin V.V. Enantioselective reduction of carbonyl compounds by yeasts *Pichia fermentans* 87-9. *Bashkirian Chemical Journal*. 2013;20(4):59-63. (In Russian). EDN: RVLKIH.



**37.** Petukhova N.I., Kolobova S.A., Nazmutdinova R.R., Zorin V.V. Cellulose synthesis by acetic acid bacteria isolates from mushroom tea. *Bashkirian Chemical Journal*. 2016;23(1):7-13. (In Russian). EDN: VSPLVX.

**38.** Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*. 1954;58(2):345-352. DOI: 10.1042/bj0580345.

**39.** Patel R.N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008;252(5-7):659-701. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.10.031.

**40.** Goldberg K., Schroer K., Lütz 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;76:249-255. DOI: 10.1007/s00253-007-1005-x.

**41.** Kratzer R., Woodley J.M., Nidetzky B. Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions. *Biotechnology Advances*. 2015;33(8):1641-1652. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.006.

**42.** Mityagina A.V., Rakhmanov T.R., Petukhova N.I., Zorin V.V. Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* VKM AC-1161. *Bashkirian Chemical Journal*. 2022;29(1):29-36. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj202212936. EDN: JIQGSM.

**43.** Erdélyi Bal., Szabó A., Seres G., Birincsik L., Ivanics J., Szatzker G., et al. Stereoselective production of (S)-1-aryl- and 1-arylethanol by freshly harvested and lyophilized yeast cells. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2006;17(2):268-274. DOI: 10.1016/j.tetasy.2005.12.025.

**44.** Andryushina V.A., Balabanova T.V., Beklemishev A.B. Varfolomeev S.D., Vodyakova M.A., Demakov V.A., et al. *Immobilized cells: biocatalysts and processes*. Moscow: Izdatel'skii tsentr RIOR; 2018, 500 p. (In Russian). EDN: YOSKMP.

**45.** Nikolskaya A.B., Holstov A.V., Lyagin I.V., Mamedova F., Efremenko E.N., Varfolomeev S.D. Immobilized *Chlorella vulgaris* cells in solution of alternative energy and ecology tasks. *Alternative Energy and Ecology*. 2012;4:95-100. (In Russian). EDN: PAVVTN.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Петухова Надежда Ивановна,**

к.б.н., доцент,  
Уфимский государственный нефтяной  
технический университет,  
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,  
Российская Федерация,  
biocatnp@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

**Колобова Светлана Андреевна,**

преподаватель,  
Уфимский государственный нефтяной  
технический университет,  
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,  
Российская Федерация,  
✉ Kulemza92@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0004-5160-2631>

**Зорин Владимир Викторович,**

д.х.н., профессор,  
Уфимский государственный нефтяной  
технический университет,  
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,  
Российская Федерация,  
zorinbiochemtech@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

#### Вклад авторов

Н.И. Петухова – разработка концепции,  
разработка методологии, написание  
черновика рукописи.  
С.А. Колобова – разработка методологии,  
проведение исследования.  
В.В. Зорин – валидация результатов,  
редактирование рукописи.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Nadezhda I. Petukhova,**

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,  
Ufa State Petroleum Technological University,  
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450062,  
Russian Federation,  
biocatnp@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

**Svetlana A. Kolobova,**

Teacher,  
Ufa State Petroleum Technological University,  
1, Kosmonavtov, St., Ufa, 450062,  
Russian Federation,  
✉ Kulemza92@mail.ru  
<https://orcid.org/0009-0004-5160-2631>

**Vladimir V. Zorin,**

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,  
Ufa State Petroleum Technological University,  
1, Kosmonavtov, St., Ufa, 450062,  
Russian Federation,  
zorinbiochemtech@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

#### Contribution of the authors

Nadezhda I. Petukhova – conceptualization,  
methodology, writing – original draft.  
Svetlana A. Kolobova – methodology,  
investigation.  
Vladimir V. Zorin – validation, editing.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии  
конфликта интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили  
окончательный вариант рукописи.*

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interests  
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved  
by all the co-authors.*

**Информация о статье**

Поступила в редакцию 04.09.2024.  
Одобрена после рецензирования 29.10.2024.  
Принята к публикации 13.11.2025.

**Information about the article**

The article was submitted 04.09.2024.  
Approved after reviewing 29.10.2024.  
Accepted for publication 13.11.2025.