

УДК 66.097.3-039.7

## АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА РЕАКЦИЙ ЭТЕРИФИКАЦИИ В СРЕДЕ ГЕКСАНА

© 2021 г. В. С. Гамаюрова<sup>а</sup>, Е. С. Воробьев<sup>а</sup>, Г. А. Давлетшина<sup>а</sup>, Л. Э. Ржечицкая<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>ФГБОУ ВО Казанский национальный исследовательский технологический университет,  
ул. К. Маркса, 68, Казань, 420065 Россия

\*e-mail: larisa.edvard@gmail.com

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 09.01.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2021 г.

С помощью метода математического моделирования выполнен анализ некоторых кинетических параметров реакции этерификаций алифатических кислот и спиртов, проводимых с участием биокатализаторов в неводных средах. Для решения кинетических уравнений применен модифицированный метод Рунге–Кутты–Мерсона, обеспечивающий заданную точность. В качестве доноров ацильных групп использованы кислоты ряда C<sub>3</sub>–C<sub>8</sub>, в качестве акцепторов – спирты ряда C<sub>4</sub>–C<sub>11</sub>, биокатализаторов – иммобилизованные ферменты Lipozyme CALB и панкреатическая липаза. Анализ расчетных данных позволил дать количественную оценку протекания в исследуемой системе трех процессов: этерификации, гидролиза и вторичной этерификации, аналогичной автокатализу. Вторичная этерификация возникает за счет того, что вода, образовавшаяся при первичной этерификации, входит в гидратную оболочку активного центра фермента, усиливая его каталитические свойства.

**Ключевые слова:** ферментативный катализ, сложный эфир, этерификация, кинетика

**DOI:** 10.31857/S0453881121030023

### ВВЕДЕНИЕ

Ферментативный катализ реакций этерификации, приводящий к синтезу сложных эфиров различного строения и назначения, в последние годы интенсивно развивается и приобретает все большее значение. Эта тенденция определяется различными факторами, прежде всего, расширением сфер использования сложных эфиров, которые и ранее производились в промышленных масштабах и находили применение, особенно в химической промышленности. Теперь, в связи с исследованиями и ростом потребления биодизельного топлива, основу которого составляют сложные эфиры низших спиртов и кислот растительных масел, роль сложных эфиров приобретает другой масштаб и значение [1]. Кроме того, происходит расширение объема и спектра ароматических веществ класса сложных эфиров, используемых в пищевой промышленности, производстве синтетических моющих средств и в ароматерапии [2].

Процессы этерификации и переэтерификации с применением липолитических ферментов стали важным направлением в пищевой промышленности для модификации жиров и растительных

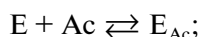
масел с целью получения жировых продуктов с функциональными свойствами [3, 4].

Ведение ферментативного катализа в неводных средах сделало возможным реализацию синтеза сложных эфиров. В настоящее время для ферментативного катализа используется ряд органических растворителей с определенными гидрофильно-гидрофобными свойствами, в основном, с  $\lg P \geq 4$  ( $P$  – коэффициент распределения растворителя в системе октанол–вода). Самым распространенным из органических растворителей является гексан как наиболее доступный и применяемый в промышленности. Нужно отметить, что практически во всех работах по ферментативному катализу реакций этерификации в неводных растворителях в реакционную среду добавляли воду в количестве 2–20%. Считалось, что она необходима для запуска процесса, т.е. фактически катализ протекает в водно-органической среде. При использовании гексана часто обходятся без добавления воды, при этом достигаются высокие выходы целевых продуктов. Это означает, что воды, содержащейся в исходных субстратах и растворителе, если они не были подвергнуты специально осушению, достаточно для старта

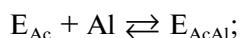
процесса [5–10]. Обзор указанных работ приведен в статье [11].

Подробный кинетический анализ ферментативной этерификации в водно-органических средах проведен в работах [12, 13]. Была исследована реакция этерификации изопропанола пальмитиновой кислотой при использовании биокатализатора Novozym 435 из *Candida antarctica* в интервале температур 65–75°C, рассчитаны основные кинетические параметры процесса. Рассмотрены три возможные модели механизмов процесса этерификации: рандом-процесс (randon–беспорядочный), пинг-понг (ping-pong) и би-би (Bi-Bi) механизмы. Во всех этих моделях стартовой реакцией является образование связи фермента с карбоксильной группой кислоты (ацил-энзимный интермедиат). Важная роль карбоксильной группы в создании активной конформации фермента подтверждена и в более поздних работах [14]. Авторы [12] пришли к заключению, что ферментативный синтез изопропилпальмитата лучше всего согласуется с упорядоченной кинетической моделью би-би-механизма, которая включает пять этапов:

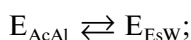
1) образование ацил-ферментного комплекса:



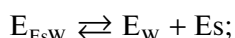
2) образование тройного комплекса:



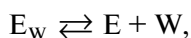
3) превращение его в сложный комплекс фермент–эфир–вода:



4) отделение от тройного комплекса сложного эфира:



5) отделение воды от фермента:



где Ac – кислота, Al – спирт, Es – эфир, W – вода.

Были определены кинетические параметры процесса этерификации глицерина олеиновой кислотой в водно-органических средах [4]. Максимальная скорость этерификации наблюдалась при использовании среды гексан–вода при активности воды ( $a_w$ ) в диапазоне 0.5–0.8. Снижение скорости реакции этерификации при увеличении активности воды свыше 0.8 авторы объясняют конкуренцией между реакциями алкоголиза и гидролиза при участии промежуточного продукта – ацил-ферментного комплекса.

В этих и аналогичных работах не рассматривается тот факт, что в активном центре фермента

протекают и другие процессы. Прежде всего, липаза катализирует не только реакцию этерификации, но и конкурентную ей реакцию гидролиза сложного эфира. Кроме того, в литературе не всегда рассматривается включение воды, добавленной или образовавшейся в результате синтеза, в гидратную оболочку фермента. Именно вода обеспечивает равновесие гидрофильно-гидрофобных сил, водородных связей, электростатического взаимодействия в белковой глобуле, обуславливая способность к ферментативному катализу [15].

В настоящей работе для решения дифференциальных уравнений, описывающих кинетические кривые процесса этерификации, применен модифицированный метод Рунге–Кутта–Мерсоном, проведены расчеты некоторых кинетических параметров этерификации кислот и спиртов алифатического ряда и их гидролиза в среде гексана без добавления воды и обнаружено явление вторичной этерификации, аналогичной автокатализу.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

В работе использованы: коммерческий препарат панкреатической липазы (Lipase from porcine pancreas) Type II лиофильно высушенный с активностью 25.0 ед./мг белка при применении оливкового масла в качестве субстрата (США); коммерческий препарат Lipozyme CALB – неспецифическая липаза, жидкая, активность 5000 ед./г, (“Novozymes”); масляная, пропионовая, валериановая, каприловая кислоты марки “ч.”; ледяная уксусная кислота марки “х. ч.”; бензиловый, амилловый, изоамиловый спирты марки “ч.”; октиловый, ундециловый спирты марки “х. ч.”; бутиловый, изобутиловый спирты марки “ч. д. а.”; гексан марки “ч.”.

### Проведение синтеза

Процесс осуществляли в органическом растворителе – гексане. Ферментные препараты липаз без дополнительной иммобилизации смешивали с органическим растворителем. Концентрация кислоты в реакционной среде составляла 0.1 моль/л, мольное соотношение кислоты и спирта – 1 : 1 и 1 : 2. Ферментативный синтез осуществляли при температуре от 30 до 40°C в течение 4–48 ч. Конверсию кислоты в процессе синтеза определяли титриметрически по убыли кислоты в системе. Титрование проводили 0.1 N спиртовым раствором NaOH в 80% этиловом спирте. Контрольный образец не содержал фер-

ментного препарата. Конверсию кислоты ( $B$ , %) рассчитывали по формуле:

$$B = ((K - O)/K) \times 100\%,$$

где  $O$  – количество 0.1 Н спиртового раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл;  $K$  – количество 0.1 Н спиртового раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля, мл.

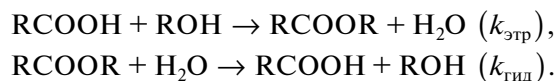
Результаты обрабатывали с помощью пакета статистических программ Statistica 6.0. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи  $t$ -критерия Стьюдента. Погрешность измерений не превышала 7%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет кинетических параметров процесса этерификации сложных эфиров алифатического ряда с использованием биокатализа был выполнен методом моделирования кинетических характеристик реакций, позволяющим вычислять скорости, подбирая различные модели их протекания. При решении обратной задачи химической кинетики применяли модифицированный метод Рунге–Кутта–Мерсона, который позволяет решать системы дифференциальных уравнений, подбирая шаг с заданной точностью. Поиск неизвестных констант скорости реакций проводили средствами оптимизации в надстройке MS Excel “Поиск решения”. Подробное описание решения показано в [16, 17]. При решении поставленной задачи были рассмотрены две кинетические модели этерификации сложных эфиров, каждая из которых включает систему из нескольких химических реакций.

1) Первая модель описывает реакцию этерификации как обратимую, протекающую под воздействием фермента, и представляет собой систе-

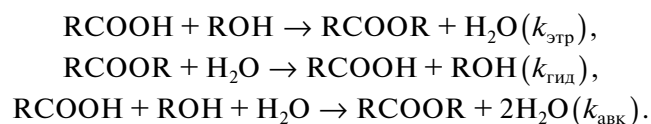
му из двух процессов: реакции этерификации (константа скорости  $k_{\text{этр}}$ ) и обратной реакции гидролиза (константа скорости  $k_{\text{гид}}$ ):



Система кинетических уравнений для первой модели (Sys\_1):

$$\begin{cases} \frac{dC_{\text{RCOON}}}{d\tau} = -k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} + \\ + k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{ROH}}}{d\tau} = -k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} + \\ + k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{RCOOR}}}{d\tau} = k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} - \\ - k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{H}_2\text{O}}}{d\tau} = k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} - \\ - k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \end{cases}$$

2) Вторая модель учитывает активирующее действие воды, выделяющейся при образовании сложного эфира, и включает соответственно три процесса: первичную этерификацию (константа скорости  $k_{\text{этр}}$ ), вторичную этерификацию, условно названную “автокаталитической” (константа скорости  $k_{\text{авк}}$ ) и гидролиз образовавшегося эфира (константа скорости  $k_{\text{гид}}$ ).



Система кинетических уравнений для второй модели (Sys\_2):

$$\begin{cases} \frac{dC_{\text{RCOON}}}{d\tau} = -k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} - k_{\text{авк}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{ROH}}}{d\tau} = -k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} - k_{\text{авк}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{RCOOR}}}{d\tau} = k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} + k_{\text{авк}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \\ \frac{dC_{\text{H}_2\text{O}}}{d\tau} = k_{\text{этр}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} + k_{\text{авк}} \times C_{\text{RCOON}} \times C_{\text{ROH}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{гид}} \times C_{\text{RCOOR}} \times C_{\text{H}_2\text{O}} \end{cases}$$

Достоверность аппроксимации выбранных моделей вычисляли через критерий Пирсона путем сравнения набора экспериментальных и расчетных значений концентраций компонентов. Для подбора

неизвестных констант реакции использовали метод наименьших квадратов. В MS Excel он реализовывался через функцию СУММКВРАЗН, которая вычисляет сумму квадратов разностей между на-

**Таблица 1.** Расчетные кинетические параметры этерификации эфиров масляной кислоты и бутилового спирта (бутилбутират) с использованием панкреатической липазы Туре II

Вариант модели	Концентрация фермента, мг/0.1 мМ	Константы скорости, моль <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>			Минимум	Критерий Пирсона
		$k_{\text{этр}}$	$k_{\text{авт}}$	$k_{\text{гид}}$		
Sys_1	5	0.0966	—	0.0000	0.2001	0.9283
Sys_2		0.0078	0.6166	0.0011	0.0084	0.9943
Sys_1	10	0.1334	—	0.0000	0.1961	0.9185
Sys_2		0.0050	0.9903	0.0031	0.0171	0.9896
Sys_1	20	0.1596	—	0.0000	0.1462	0.9108
Sys_2		0.0121	1.1010	0.0141	0.0152	0.9857

Прочерки означают, что модель не учитывает процесс вторичной этерификации.

борами экспериментальных и расчетных значений концентрации компонентов.

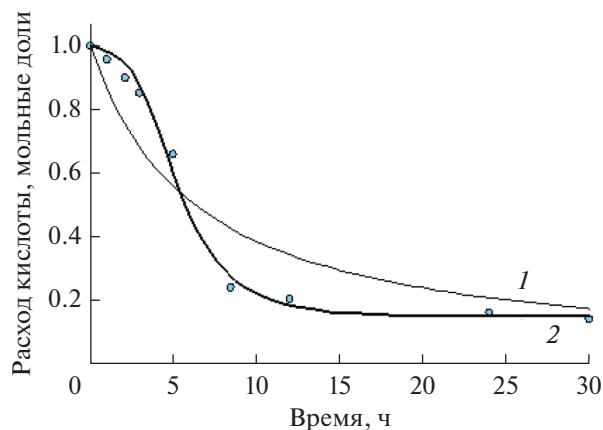
Влияние спиртовых субстратов при ферментативном катализе синтеза сложных эфиров алифатического ряда исследовано на примере синтеза эфиров масляной кислоты. Процесс вели в гексане, в качестве катализатора использовали панкреатическую липазу Туре II. Концентрацию фермента варьировали в диапазоне 5–30 мг на 0.1 мМ кислоты, температура реакции 30°C. Донором ацильных групп выступала масляная кислота, а акцепторами следующие спирты: *n*-бутиловый, изобутиловый, *n*-амиловый, изоамиловый, *n*-октиловый, *n*-ундециловый. Соотношение кислоты : спирт составляло 1 : 2. Для расчета кинетических параметров были использованы эксперимен-

тальные данные, приведенные в более ранней работе [18].

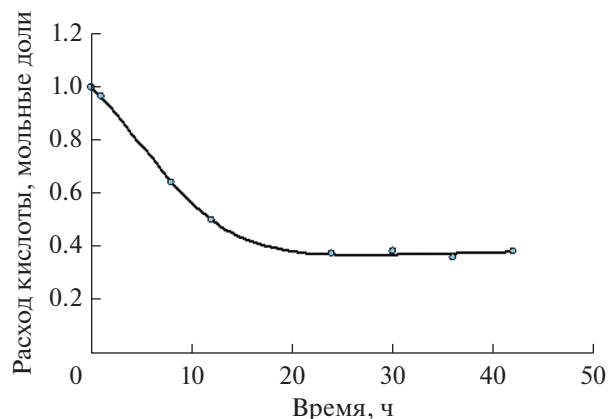
Сравнительный анализ достоверности моделей Sys\_1 и Sys\_2 для расчета констант скорости процесса синтеза бутилбутирата дан в табл. 1.

Как видно из представленных в табл. 1 расчетных данных, критерий Пирсона для модели Sys\_2 на 7–11% выше, чем для модели Sys\_1 при всех значениях концентрации фермента. Это подтверждается графически при сравнении экспериментальных и расчетных концентрационных кривых расхода кислоты при синтезе эфиров масляной кислоты, описанных с помощью моделей Sys\_1 и Sys\_2 (рис. 1). Все это говорит о том, что модель Sys\_2 наиболее адекватно отражает процессы, протекающие в системе, по сравнению с моделью Sys\_1.

В подтверждение этого на рис. 2 в качестве примера приведен график сходимости расчетных



**Рис. 1.** Сравнение экспериментальных (точки) и расчетных (линии) данных по этерификации масляной кислоты бутиловым спиртом. Концентрация панкреатической липазы Туре II – 10 мг/0.1 мМ кислоты. Критерий Пирсона 0.9185, критерий оптимизации 0.1961 для функции Sys\_1 (1); критерий Пирсона 0.9896, критерий оптимизации 0.0171 для функции Sys\_2 (2).



**Рис. 2.** Сравнение экспериментальных данных (точки) и расчетных значений, описанных моделью Sys\_2 (линия), при синтезе ундецилбутирата. Концентрация панкреатической липазы Туре II – 30 мг/0.1 мМ кислоты.

**Таблица 2.** Расчетные кинетические параметры этерификации различных спиртов масляной кислотой (модель Sys\_2) с использованием панкреатической липазы Туре II

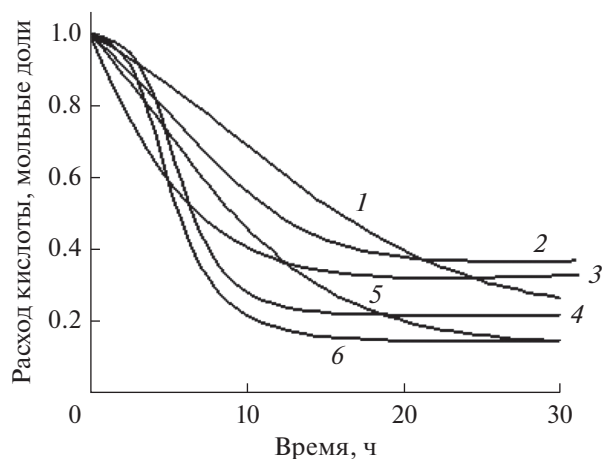
Наименование эфира	Концентрация фермента, мг/0.1 мМ	Константы скорости, моль <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>			Минимум	Критерий Пирсона
		$k_{\text{этр}}$	$k_{\text{авт}}$	$k_{\text{гид}}$		
<i>n</i> -Бутилбутират	5	0.0078	0.6166	0.0011	0.0084	0.9943
	10	0.0050	0.9903	0.0031	0.0171	0.9896
	20	0.0121	1.1010	0.0141	0.0152	0.9857
<i>n</i> -Амилбутират	5	0.0093	0.3024	0.0000	0.0069	0.9775
	10	0.0417	0.3434	0.0000	0.0014	0.9905
	20	0.0076	1.0217	0.03120	0.0013	0.9284
<i>изо</i> -Амилбутират	5	0.0047	0.0842	0.0000	0.0005	0.9989
	10	0.0064	0.1768	0.0107	0.0026	0.9974
	20	0.0243	0.1290	0.0144	0.0031	0.9959
<i>изо</i> -Бутилбутират	5	0.0094	0.0555	0.0054	0.0011	0.9976
	10	0.0132	0.0785	0.0199	0.0011	0.9976
	20	0.0122	0.0902	0.0177	0.0000	1.0000
Октилбутират	10	0.0050	0.2609	0.0690	0.0001	0.9998
	20	0.0150	0.1947	0.0509	0.0008	0.9983
	30	0.524	0.0789	0.0571	0.0011	0.9955
Ундецилбутират	10	0.0052	0.0704	0.0283	0.0033	0.9912
	20	0.0201	0.0647	0.0354	0.0011	0.9969
	30	0.0188	0.1276	0.0604	0.0004	0.9988

и экспериментальных концентрационных кривых при синтезе ундецилового эфира масляной кислоты в системе кинетических уравнений второй модели (Sys\_2).

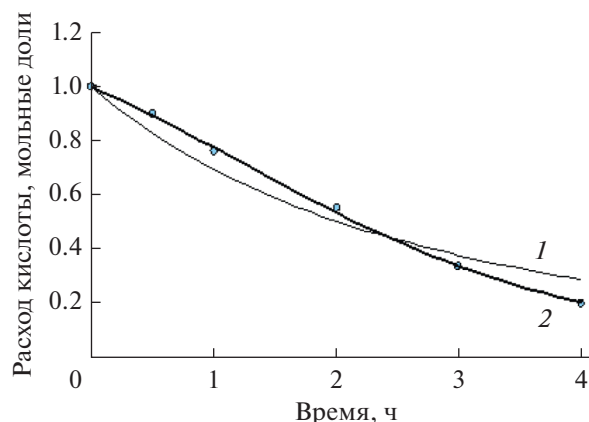
Таким образом, получены статистически значимые доказательства, что модель Sys\_2 хорошо описывает экспериментальные данные, и именно она взята за основу при дальнейших расчетах. Таблица 2 содержит сводные результаты проведенных расчетов процесса этерификации масляной кислоты различными спиртами под действием панкреатической липазой Туре II с использованием модели Sys\_2.

Анализ представленных результатов показывает хорошую сходимость набора расчетных и экспериментальных данных в том случае, когда учтены все три процесса: первичная этерифика-

ция, гидролиз и вторичная этерификация, названная нами автокатализ и протекающая при включении вновь образованной воды в ферментную систему. Полученные данные свидетельствуют о том, что в активном центре фермента кроме процессов этерификации и гидролиза протекает еще и процесс включения воды, образовавшейся в результате синтеза эфира, в гидратную оболочку фермента. Известно, что гидратная оболочка в активном центре необходима для формирования нативной конформации фермента, поскольку она обеспечивает сложный комплекс водородных связей, электростатического и гидрофобного взаимодействий. Утрата гидратной оболочки ведет к потере каталитических свойств фермента. Процесс включения воды условно назван нами “автокатализ”, поскольку он обеспечивает сохранение



**Рис. 3.** Расчетные концентрационные кривые (Sys\_2) расхода масляной кислоты в процессе этерификации спиртами: 1 – изобутиловым, 2 – ундециловым, 3 – октиловым, 4 – гептиловым, 5 – изоамиловым, 6 – *n*-бутиловым. Концентрация панкреатической липазы Туре II – 20 мг/0.1 мМ кислоты.



**Рис. 4.** Сравнение расчетных (точки) и экспериментальных (линии) данных по этерификации бензилового спирта и пропионовой кислоты при концентрации биокатализатора Lyrozume CALB – 30 мкл/0.1 мМ кислоты. Критерий Пирсона 0.9901, критерий оптимизации 0.0213 для функции Sys\_1 (1); критерий Пирсона 0.9985, критерий оптимизации 0.0005 для функции Sys\_2 (2).

ферментативной активности и продолжение синтеза эфиров. При этом автокатализ, как показывают данные табл. 2, преобладает над прямой этерификацией во всех использованных вариантах эксперимента ( $k_{авт} > k_{этр}$ ), в то время как гидролиз вносит меньший вклад в суммарный процесс.

Наличие автокатализа подтверждено ранее экспериментально [19] при использовании панкреатической липазы Туре II в реакциях этерификации в неводных средах. Было установлено, что при многократном применении фермента (рециклизации) наблюдается не снижение, а напротив, повышение ферментативной активности в течение 10 рециклов. Это объясняется включением воды, образующейся при этерификации, в ферментную систему, что ведет к сохранению и даже к возрастанию ее активности (автокатализ).

На рис. 3 приведена зависимость суммарного расхода кислоты от времени в процессе этерификации масляной кислоты различными спиртами при концентрации фермента 20 мг/0.1 мМ кислоты.

Как видно из рис. 3, *n*-бутиловый спирт наиболее быстро подвергается этерификации, а ундециловый спирт, имеющий самую длинную углеводородную цепь, этерифицируется медленнее всех. Сравнение скорости расхода масляной кислоты в процессе образования эфиров позволяет построить следующий ряд снижения скорости реакции этерификации в зависимости от природы спиртовых субстратов:

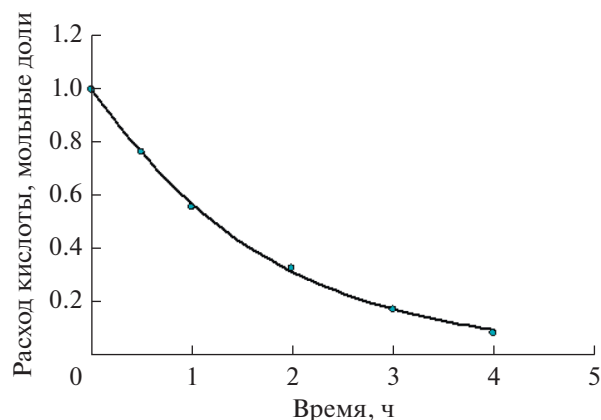
$$C_4 > C_5 > \text{изо-}C_5 > \text{изо-}C_4 > C_8 > C_{11}.$$

Таким образом, скорость реакции этерификации алифатических спиртов снижается с увеличением длины углеводородной цепи спиртов и их

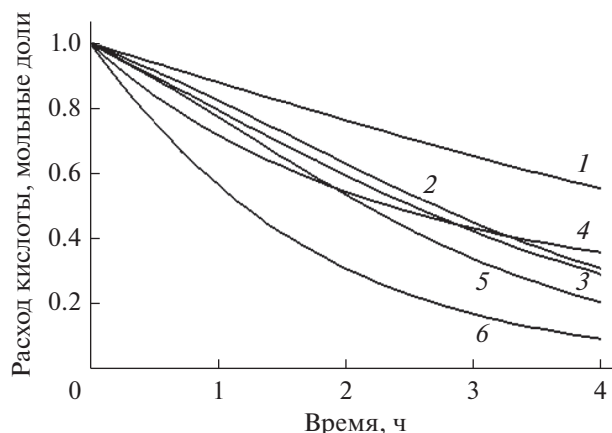
**Таблица 3.** Расчетные кинетические параметры этерификации эфира масляной кислоты и бензилового спирта (бензилбутирата) с использованием Lyrozume CALB\*

Модель	Константы скорости, моль <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>			Минимум	Критерий Пирсона
	$k_{этр}$	$k_{авт}$	$k_{гид}$		
Sys_1	0.1485	—	0.0000	0.0175	0.9568
Sys_2	0.0798	0.4299	0.0000	0.0042	0.9847

\* Концентрации биокатализатора – 30 мкл/0.1 мМ кислоты. Прочерки означают, что модель не учитывает процесс вторичной этерификации.



**Рис. 5.** Сравнение экспериментальных данных (точки) и расчетных значений, описанных моделью Sys\_2 (линия), при синтезе бензилацетата. Концентрация *Lipozyme CALB* – 30 мкл/0.1 мМ кислоты.



**Рис. 6.** Расчетные концентрационные кривые (Sys\_2) расхода кислот в процессе этерификации бензилового спирта и алифатических кислот: 1 – каприловой, 2 – масляной, 3 – валериановой, 4 – капроновой, 5 – пропионовой, 6 – уксусной. Концентрация фермента *Lipozyme CALB* – 30 мкл/0.1 мМ кислоты.

разветвленности независимо от концентрации фермента.

Кинетический анализ проведен также для реакций этерификации, в которых в качестве акцептора ацильных групп использовали бензиловый спирт. Донорами ацильных групп были кислоты алифатического ряда: уксусная, пропионовая, масляная, валериановая и каприловая. Все эксперименты вели в растворе гексана, фермент – липаза *Lipozyme CALB*.

Кинетические параметры анализировали аналогично тому, как было описано выше, путем сравнения расчетных величин критерия Пирсона для обеих моделей. Например, в табл. 3 приведено сравнение достоверности аппроксимации моделей Sys\_1 и Sys\_2 при расчете констант скорости синтеза бензилбутирата с использованием в

качестве донора ацильной группы масляной кислоты.

На рис. 4 показаны экспериментальные и расчетные концентрационные зависимости процесса этерификации бензилового спирта пропионовой кислотой, описанные с помощью моделей Sys\_1 и Sys\_2.

График сходимости расчетных и экспериментальных концентрационных кривых при синтезе бензилового эфира уксусной кислоты (бензилацетата) в системе кинетических уравнений второй модели (Sys\_2) представлен на рис. 5.

Эти результаты также свидетельствуют, что модель Sys\_2 более адекватно описывает экспериментальные данные. Таблица 4 содержит свод-

**Таблица 4.** Расчетные кинетические параметры этерификации бензилового спирта алифатическими кислотами с использованием модели Sys\_2 при концентрации биокатализатора *Lipozyme CALB*\*

Наименование эфира	Константы скорости, моль <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>			Минимум	Критерий Пирсона
	$k_{\text{этр}}$	$k_{\text{авт}}$	$k_{\text{гид}}$		
Бензилацетат	0.2622	0.4643	0.0000	0.0005	0.9983
Бензилпропионат	0.1011	0.5332	0.0000	0.0005	0.9985
Бензилбутират	0.0798	0.4299	0.0000	0.0042	0.9847
Бензилвалерат	0.0984	0.3858	0.0000	0.0011	0.9960
Бензилкаприлат	0.0595	0.1817	0.0000	0.0002	0.9985

\* Концентрации биокатализатора – 30 мкл/0.1 мМ кислоты.

ные расчетные значения кинетических параметров этерификации бензилового спирта алифатическими кислотами с использованием модели Sys\_2.

Приведенные в табл. 4 кинетические параметры говорят об отсутствии обратной реакции – гидролиза эфиров – для всех использованных кислот. При этом автокатализ значительно преобладает над первичной “прямой” реакцией этерификации. На рис. 6 показана зависимость суммарного расхода кислоты от времени в процессе этерификации бензилового спирта алифатическими кислотами.

Анализ концентрационных кривых (рис. 6) свидетельствует, что скорость образования эфира зависит от длины углеводородной цепи кислоты и снижается в ряду: уксусная > пропионовая > масляная > валериановая > каприловая, что соответствует расходу кислот в процессе этерификации бензилового спирта.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение модифицированного метода Рунге–Кутты–Мерсона для решения дифференциальных уравнений при описании процесса биокатализа реакций этерификации алифатических кислот и спиртов позволило установить одновременное протекание трех процессов: первичной (прямой) этерификации, гидролиза образовавшегося эфира (обратной реакции) и вторичной этерификации (автокатализа). Процесс автокатализа обусловлен включением воды, образовавшейся в первичной этерификации, в гидратную оболочку фермента, тем самым усиливая его каталитические свойства.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. *Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Пармон В.Н.* // Катализ в промышленности. 2018. Т. 18. № 6. С. 61. <https://doi.org/10/1842/1816-0387-2018-6-61-73>
2. *Смирнов Е.В.* Пищевые ароматизаторы. Справочник. Санкт-Петербург: ЦОП “Профессия”, 2008. 736 с.
3. *Шеламова С.А.* Биотехнологические основы конверсии триглицеридов: монография. Воронеж: Научная книга, 2008. 145 с.
4. *Тырсин Ю.А., Шеламова С.А.* Механизм гидролиза, синтеза и переэтерификации в пищевой биотехнологии: монография. Воронеж: Научная книга, 2012. 124 с.
5. *Bartling K., Thompson J.U.S., Pfromm P.H., Czermak P., Rezac M.E.* // Biotechnol. Bioeng. 2011. V. 75. P. 676. <https://doi.org/10.1002/bit.1193>
6. *Aissa I., Sellami M., Kamoun A., Gargouri Y., Miled N.* // Curr. Chem. Biol. 2012. V. 6. P. 77. <https://doi.org/10.2174/187231312799984376>
7. *Larios A., Garcia H.S., Oliart R.M., Valerio-Alfaro G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. P. 373. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1602-x>
8. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Елизарова Е.В.* // Катализ в промышленности. 2008. Т. 3. С. 54.
9. *Matle C.R., Bordinhao C., Poppe J.K., Rodrigues R.C., Hertz P.F.* // J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 2016. V. 127. P. 67.
10. *Гамаюрова В.С., Шнайдер К.Л., Джамай М.Д.* // Катализ в промышленности. 2016. Т. 16. № 3. С. 64. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2016-3-64-68>
11. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Шнайдер К.Л., Давлетшина Г.А.* // Катализ в промышленности. 2020. Т. 20. С. 216. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2020-3-216-233>
12. *Garcia T., Sanchez N., Martinez M., Aracil J.* // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. P. 584. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00082-4](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00082-4)
13. *Garcia T., Sanchez N., Martinez M., Aracil, J.* // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. P. 591. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00083-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00083-6)
14. *Шеламова С.А., Тырсин Ю.А.* // Научные ведомости. 2014. Т. 3(174). Вып. 2. С. 103.
15. *Аксенов С.И.* Вода и ее роль в регулировании биологических процессов. Москва–Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2004. 212 с.
16. *Коробов В.И., Очков В.Ф.* Химическая кинетика: введение с Mathcad/Maple/MCS. Москва: Горячая линия – Телеком. 2009. 384 с.
17. *Ерандаева Ю.В., Воробьев Е.С., Воробьева Ф.И.* // Вестник Казанского технологического университета. 2011. Т. 11. С. 88.
18. *Gamayurova V.S., Shnaider K.L., Zaripova S.K., Mataz J., Jamai M.D.* // J. Thermodyn. Catal. 2016. V. 7. P. 161. <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000161>
19. *Гамаюрова В.С., Давлетшина Г.А.* // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. № 3. С. 515. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-515-521>



## Analysis of the Kinetic Parameters of the Enzymative Catalysis of Esterification Reactions in the Medium of Hexane

V. S. Gamayurova<sup>1</sup>, E. S. Vorobiev<sup>1</sup>, G. A. Davletshina<sup>1</sup>, and L. E. Rzhchitskaya<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Kazan National Research Technological University, K. Marks str., 68, Kazan, 420065 Russia*

*\*e-mail: larisa.edvard@gmail.com*

The method of mathematical modeling is applied to analyze some of the kinetic parameters of the esterification reaction of aliphatic acids and alcohols, carried out with the participation of biocatalysts in non-aqueous media. To solve the kinetic equations, a modified Runge–Kutta–Merson method is used, which provides the specified accuracy. Acids of the C<sub>3</sub>–C<sub>8</sub> series acted as donors of acyl groups, alcohols of the C<sub>4</sub>–C<sub>11</sub> series – acceptors, biocatalysts – non-immobilized enzymes Lipozyme CALB and pancreatic lipase. Analysis of the calculated data made it possible to quantify the course of three processes in the system under study: esterification, hydrolysis, and secondary esterification similar to autocatalysis. The analysis showed the presence of three processes in the system: esterification, hydrolysis and secondary esterification, similar to autocatalysis, and made it possible to quantify them. Secondary esterification occurs because water formed during primary esterification enters the hydration shell of the active center of the enzyme, increasing its catalytic properties

**Keywords:** enzymatic catalysis, ester, esterification, kinetics