

УДК 577.154.2+542.952+579.22

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ И ПРОЦЕССЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КОНВЕРСИИ СУБСТРАТОВ В ЦЕННЫЕ ПРОДУКТЫ ХИМИЧЕСКОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА. ОБЗОР ОТЕЧЕСТВЕННЫХ РАЗРАБОТОК

© 2023 г. Г. А. Коваленко*

ФГБУН ФИЦ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН,
просп. Акад. Лаврентьева, 5, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: galina@catalysis.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Биокатализ, как в гомогенном, так и гетерогенном вариантах, — самостоятельное междисциплинарное направление научно-практических исследований одностадийных процессов конверсии исходных реагентов (субстратов) в ценные, востребованные на рынке продукты с участием, в большинстве случаев, одного фермента-катализатора. Биокаталитические *одноферментные* процессы, обладающие всеми специфическими особенностями ферментативного катализа, являются альтернативными, вполне конкурентоспособными по сравнению с традиционными химическими производствами. В настоящем обзоре представлена информация о результатах российских научно-исследовательских групп/лабораторий, активно и продуктивно работающих в области биокатализа в течение последних десятков лет и имеющих практические разработки, защищенные патентами РФ, которые при благоприятном стечении обстоятельств могут быть предложены коммерческим предприятиям/компаниям для апробации и использования в лабораторном и/или полупромышленном масштабе с перспективой промышленного масштабирования. В обзоре особое внимание уделено целенаправленным систематическим исследованиям липолитических ферментов (липаз), обладающих уникальной способностью катализировать реакции в среде органических растворителей, прежде всего, реакции этерификации и переэтерификации, в результате которых получают ценные продукты органического синтеза — сложные эфиры (СЭ). Липазы являются активными компонентами гетерогенных биокатализаторов (БК), приготовленных путем закрепления (иммобилизации) этих ферментов на поверхности твердых носителей-адсорбентов. В обзоре кратко описаны результаты работ отечественных научных коллективов, приведена полная библиография их публикаций, в которых представлена информация о способах иммобилизации целевых ферментов, каталитических свойствах разработанных биокатализаторов (ферментативной активности, субстратной специфичности, операционной стабильности), а также описаны условия проведения биокаталитических процессов с участием гетерогенных БК, таких как синтез акриламида и разнообразных сложных эфиров. С учетом средней активности (A), близкой к активности, измеряемой при времени полуинактивации ($t_{1/2}$), и операционной стабильности БК, характеризующейся величиной $t_{1/2}$, проведена довольно грубая оценка продуктивности биокатализаторов путем расчета количества произведенного ценного продукта (в тоннах) на 1 кг БК.

Ключевые слова: биокатализ, гетерогенные биокатализаторы, одноферментная конверсия субстрата, амидазы, гидролиз, акриламид, липазы, этерификация, сложные эфиры

DOI: 10.31857/S0453881123050052, **EDN:** TSVPPM

ВВЕДЕНИЕ

Биокатализ как самостоятельное научно-практическое направление биотехнологии сфор-

мировался более полувека тому назад и в начале своего становления назывался “инженерная (или прикладная) энзимология” [1–3]. Исследования

Сокращения и обозначения: СЭ — сложные эфиры; БК — биокатализатор; БКП — биокаталитические процессы; $A_{\text{имм}}$ — активность иммобилизованного фермента, $A_{\text{р-р}}$ — активность фермента в растворе, A — средняя активность БК; $t_{1/2}$ — время полуинактивации БК; ФАС — ферментативно-активная субстанция; НГ — нитрилгидратаза; КВУ — каталитический волоконистый углерод; ЖК — жирная кислота; МЭЖК — метиловые эфиры жирных кислот; ЭЭЖК — этиловые эфиры жирных кислот; ПАВ — поверхностно-активное вещество; ПА — панкреатическая липаза; ДЭЭ — диэтиловый эфир; УНТ — углеродная нанотрубка; Г — гексан; P — коэффициент распределения в двухфазной системе вода/октанол; КМ — компьютерное моделирование; TLL — липаза из *Thermomyces lanuginosus*.

в этой области полностью посвящены решению глубоко практических задач целенаправленного превращения (конверсии) исходного реагента (субстрата) в востребованный рынком продукт с помощью одной (реже нескольких) ферментативных реакций. Главной конечной целью, которая ставится перед специалистами в области биокатализа, является разработка всей технологии производства целевого продукта, включая приготовление коммерчески привлекательных высокоактивных и стабильных БК, дизайн высокопроизводительных реакторов (идеального смешения, или идеального вытеснения, или вихревого), специально сконструированных для биокаталитических процессов. В последнее время в связи с развитием молекулярной биологии и генетической инженерии возникает насущная необходимость конструирования рекомбинантных штаммов, в больших количествах продуцирующих целевой фермент с заданными и/или требуемыми каталитическими свойствами. При этом желательно, чтобы продуцируемый фермент был внклеточным и секретировался в ростовую среду, что значительно облегчает его выделение и частичную очистку. Данное, несомненно, важное свойство генно-инженерных штаммов-продуцентов приводит к существенному снижению цены рекомбинантных ферментов и стоимости БК, приготовленных на их основе, и, в конечном итоге, к существенному удешевлению конечного рыночного продукта. Очевидно, что специалистам в области биокатализа требуются знания, навыки и компетенции из различных областей: биохимии, энзимологии, микробиологии и генной инженерии, ферментативного катализа, а также кинетики, макрокинетики, химической технологии и инженерных дисциплин.

Для успешного внедрения биокатализа в промышленное производство следует проводить научно-практические исследования в двух основных направлениях. Первое – это биокаталитические процессы получения *инновационного*, ранее не известного на рынке продукта, причем попытки получения данного продукта химическим путем являются явно безуспешными. Ярким примером является крупнотоннажное производство глюкозо-фруктозных сиропов из крахмала, последняя стадия которого – одноферментная изомеризация глюкозы с участием иммобилизованной глюкозоизомеразы [1, 4]. Второе направление – это биокаталитические, *альтернативные* химическим, процессы синтеза уже известного химикам продукта, но значительно лучшего качества, например, обладающего выраженной регио- или стереоспецифичностью, что не характерно для химических реакций. Примером может служить производство оптического *L*-изомера яблочной кислоты гидратацией фумаровой кислоты с участием иммобилизованной фумаразы [1]. С точки зрения химика, наиболее интересное направле-

ние в биокатализе – разработка альтернативных, низкотемпературных технологий для производства известных продуктов органического синтеза с помощью ферментов – уникальных катализаторов биологической природы. В монографиях [4–10] описаны разнообразные биокаталитические процессы (БКП) ферментативной конверсии субстратов в ценные продукты, приведены примеры БКП, реализованных в промышленном масштабе, и их технологические схемы.

Промышленная реализация *гетерогенных* БКП началась в 1970–1980 гг. В настоящее время эффективно работают 10 крупнотоннажных производств с участием гетерогенных биокатализаторов (табл. 1); 134 коммерческих биокаталитических процесса описаны в монографиях [1, 4–8]. Основой коммерчески привлекательного технологического решения БКП является активный и стабильный *гетерогенный биокатализатор*, приготовленный путем иммобилизации ферментивно-активной субстанции (ФАС) на/в различных по химической природе носителях/матрицах. В качестве ФАС используют не только выделенные индивидуальными ферменты, но и целые, частично или полностью разрушенные микроорганизмы-продуценты [11]. Носители неорганической природы, такие как природные минералы (глины, цеолиты), оксиды металлов и материалы на основе диоксида кремния (силикагели, аэросилы), рассматриваются как наиболее перспективные для производства коммерчески привлекательных БК благодаря их химической инертности, высокой устойчивости в реакционных средах и относительно низкой стоимости. Хотя неорганические носители уступают по адсорбционным свойствам органическим полимерам и полисахаридам (целлюлозе), но значительно превосходят их по механической прочности и гидродинамическим параметрам, что необходимо для эффективной работы реакторов различного типа, таких как проточные реакторы вытеснения с неподвижным или псевдооживленным слоем БК, либо периодические реакторы смешения, либо вихревые реакторы.

Следует еще раз подчеркнуть, что биокаталитические процессы промышленного масштаба (табл. 1, [8]) осуществляют в *гетерогенном варианте*, т.е., с участием гетерогенных (твердофазных) БК. Согласно всем приведенным в литературе экономическим оценкам, именно гетерогенные процессы, проводимые в реакторах непрерывного действия, являются наиболее экономически выгодными с точки зрения существенного снижения стоимости конечного продукта по сравнению с гомогенными технологиями. Так, компания “TANABE SEYAKU” (Япония, 1973 г.) сравнила затраты на производство ценного продукта – *L*-аспарагиновой кислоты – в гетерогенном и гомогенном вариантах. Расчеты показали, что за счет многократного использования иммоби-

Таблица 1. Промышленные биокаталитические гетерогенные процессы

Продукт	Фермент как активный компонент биокатализатора	Объем производства, т/год
Глюкозо-фруктозные сиропы	Глюкозоизомераза	10 ⁷
Акриламид*	Нитрилгидратаза	10 ⁵
Переэтерифицированные пищевые жировые продукты*	Липаза	10 ⁵
Безлактозное молоко	Лактаза	10 ⁵
Биодизель*	Липаза	10 ⁴
Модифицированные антибиотики* (ампицилин)	Пенициллин G ацилаза	10 ⁴
L-Аспарагиновая кислота (из fumarовой кислоты)	Аспартаза	10 ⁴
Аспартам® (посластитель)	Термолизин	10 ⁴
Энантиомеры спиртов и аминов* (хиральное разделение)	Липаза	10 ³

* Традиционные продукты химической промышленности.

лизованных ФАС и существенного повышения стабильности ключевого фермента аспартазы стоимость БК уменьшилась в ~9 раз, а затраты всего процесса, включающего стадию отделения готового продукта от БК и его очистку – в 1.4 раза [1]. С тех пор расчеты экономической эффективности гетерогенных биокаталитических процессов по сравнению с их гомогенными вариантами не изменились (или поменялись в более выгодную сторону), поскольку для иммобилизации применяют более дешевые рекомбинантные ферменты, получаемые методами генетической инженерии и молекулярного дизайна, а также апробируются подходы так называемой “ферментной инженерии”, заключающиеся в модуляции (изменении, управлении, контроле) каталитических свойств иммобилизованных ферментов путем выбора носителя и условий приготовления гетерогенных БК, что вполне созвучно названию и задачам “инженерной энзимологии” [1].

“Ферментная инженерия”, по мнению авторов обзора [12], полностью совместима с другими химическими и/или биологическими подходами, используемыми для улучшения функциональных свойств ферментов, и успех данной “инженерной” работы определяется доступностью широкого набора протоколов (способов) иммобилизации. Несомненно, управление функциональными свойствами ферментов с помощью “ферментной инженерии” является интересным и перспективным направлением в развитии гетерогенного биокатализа. Следует обратить также внимание на обзор [13], в котором авторы провели масштабный критический анализ данных из 519 литературных источников, в том числе из работ, выполненных в последние 5 лет. В этом обзоре описаны все существующие способы (протоколы) иммо-

билизации ферментов; влияние процесса иммобилизации на конечные свойства приготовленных БК; типы реакторов, условия масштабирования и осуществления промышленных биокаталитических процессов, а также проведено обсуждение исключительно коммерческих вопросов, например, логистических проблем, которые необходимо рассмотреть, прежде чем принимать решение об использовании иммобилизованного фермента в промышленных масштабах. Авторы на вопрос “Является ли иммобилизация ферментов зрелой дисциплиной?” дали следующий ответ: “хотя многие исследователи считают иммобилизацию ферментов зрелой дисциплиной, в которой почти все уже сделано, мы скорее считаем, что иммобилизация ферментов требует еще более глубоких исследований” для составления оптимальных протоколов иммобилизации, а также для объяснения нежелательных воздействий на фермент в процессе иммобилизации с целью исключения их негативного влияния на свойства приготовленного БК. Таким образом, можно сделать вывод о том, что, как и полвека тому назад, разработка активного и стабильного коммерчески привлекательного БК – это задача с оптимальным решением, в котором все компоненты – природа фермента и носителя, способ иммобилизации, условия реакции и процесса в целом – играют одинаково важную роль.

Основные требования к коммерческим гетерогенным БК, очевидно, определяются параметрами конкретного биокаталитического процесса, а также востребованностью и стоимостью конечного продукта на рынке. Так, технические условия к БК, осуществляющим синтез дорогостоящих хиральных производных для фармацевтической промышленности, отличаются от тех, что предъявляют к БК для многотоннажного произ-

Таблица 2. Сравнение стоимости иммобилизованного и растворимого фермента, используемых в биокаталитических процессах

Параметр	Сравнительный фактор
Фермент в растворе — основа для расчетов	1
Стабилизация фермента при иммобилизации	2
Стоимость 1 единицы активности (с учетом потери активности при иммобилизации, а также стоимости носителя и метода иммобилизации, затрат труда на приготовление гетерогенного биокатализатора)	1/10
Число рециклов при многократном использовании до потери 50% первоначальной активности	×200
Сравнительная стоимость иммобилизованного фермента	40/1

водства, например, глюкозо-фруктозных сиропов для пищевой промышленности. Как отмечалось выше, оптимальные носитель и метод иммобилизации для приготовления гетерогенного БК выбираются индивидуально и конкретно с учетом следующих основных требуемых параметров.

Первое — сравнительно высокая ферментативная активность, обеспечивающая конверсию субстрата, близкую к 50%, за десятки минут. В большинстве случаев при иммобилизации ФАС она частично или практически полностью теряется. Оптимальный баланс сохранившейся после иммобилизации активности фермента ($A_{\text{имм}}$) по сравнению с его нативной (природной) растворимой формой ($A_{\text{р-р}}$) следующий: сохранение активного состояния ФАС после иммобилизации — не менее чем на 45%; потеря активности вследствие инактивации самого фермента при взаимодействии с носителем — до 25%, “скрытая” $A_{\text{имм}}$ из-за диффузионных ограничений — не более 20%. Однако в некоторых случаях отношение $A_{\text{имм}}/A_{\text{р-р}}$ превышает 100%, наблюдается так называемая гиперактивация фермента, что особенно характерно для липаз, иммобилизованных на гидрофобных носителях, как описано ниже.

Второе требование к БК — высокая операционная стабильность в условиях его функционирования (эксплуатации), а также повышенная термостабильность, позволяющая проводить процесс со значительными скоростями в относительно стерильных условиях ($>50^\circ\text{C}$). Данный параметр БК обеспечивает работу реактора без его перезагрузки в течение продолжительного времени: в течение десятков-сотен реакционных циклов (для периодического процесса) и не менее 0.5–1 года (для непрерывного процесса).

Третье — относительно низкая стоимость БК, включая стоимость фермента как активного компонента, носителя и метода иммобилизации. Соблюдение этого условия способствует тому, что вклад БК в стоимость конечного продукта не превышает 10% (лучше 1%). Интересные результаты сравнительного анализа приведены в моногра-

фии [7] (табл. 2). Так, даже при достаточно низкой стабилизации иммобилизованного фермента (лишь в ~2 раза стабильнее растворимого аналога), но при возможности проведения 200 реакционных циклов, гетерогенный БК становится в 40 раз дешевле, чем его гомогенный аналог — фермент в растворе, который по сути является расходным материалом и теряется в 1-ом реакционном цикле.

Все перечисленные выше требования влияют на величину продуктивности коммерческих катализаторов, которая оценивается в количестве произведенного продукта (кг, т) на единицу катализатора (кг, л, м³) за время его функционирования (ч). Продуктивность как химических катализаторов, так и БК можно довольно грубо оценить путем умножения величины 1/2 начальной активности на время полуинактивации ($t_{1/2}$) в предположении, что процесс инактивации описывается кинетикой реакции 1-го порядка. Поскольку БК является сравнительно дорогостоящим катализатором, то в промышленных условиях его эксплуатация заканчивается при потере 75% первоначальной активности, а не 50%, как для катализатора химической природы, т.е., для оценки продуктивности БК используют $2t_{1/2}$ [1]. Например, если время полуинактивации БК ($t_{1/2}$) превышает 120 сут, то реактор работает без перезагрузки в течение 1 года, что обеспечивает суммарную продуктивность процесса, равную нескольким тонам продукта в расчете на 1 кг БК.

В настоящем обзоре приведены сведения о научно-практических исследованиях российских ученых, работающих в области гетерогенного биокатализа последние десятилетия. Описаны разработанные ими гетерогенные БК и их каталитические свойства, оценена их продуктивность, а также рассмотрены подходы к проведению альтернативных процессов ферментативной конверсии исходных реагентов (субстратов) в ценные, востребованные на рынке химические продукты. Наибольшее внимание уделено БК, активным компонентом которых являются иммобилизованные рекомбинантные липазы, осуществляющие

биокаталитические процессы низкотемпературного синтеза сложных эфиров. Обзор разделен на части, каждая из которых посвящена процессу одноферментной конверсии субстрата в соответствующий продукт химического синтеза — акриламид и сложные эфиры. В начале каждой части приведена краткая характеристика как соответствующего продукта, так и химического процесса его промышленного производства. Затем рассмотрен альтернативный биокаталитический метод получения того же самого химического продукта с участием БК, способы приготовления которых защищены патентами РФ.

ЧАСТЬ 1. АКРИЛАМИД, АКРИЛОВАЯ КИСЛОТА

Акриламид (2-пропенамид, амид акриловой кислоты), $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NH}_2$ — мономер, применяемый в основном в многотоннажном производстве полимеров, имеющих общее название полиакриламиды. В промышленности акриламид получают в результате проведения следующих процессов. Первый — гомогенный гидролиз акрилонитрила 84.5%-ной серной кислотой при 80–100°C в присутствии ингибиторов полимеризации (соли Cu или Fe, сера, фенотиазин). Затем образовавшуюся серноокислую соль акриламида нейтрализуют стехиометрическим количеством NH_3 или $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (известковое молоко). Второй — гетерогенный гидролиз акрилонитрила при 80–120°C в присутствии медных катализаторов (медь Ренея, $\text{Cu}/\text{Cr}_2\text{O}_3$, $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$), который характеризуется высокой степенью превращения акрилонитрила, равной 98.5%; при этом основной примесью является гидроксипропионитрил (менее 0.1%). Гетерогенный процесс по экономическим показателям выгоднее гомогенного, кроме того, отвечает требованиям защиты окружающей среды.

Акриловая кислота (пропеновая кислота, этиленкарбоновая кислота), $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ — простейшая одноосновная непредельная монокарбоновая кислота. Служит исходным сырьем в производстве лаков, дисперсий, входящих в состав водоэмульсионных красок, полиакрилонитрильных волокон и акриловых каучуков, строительных смесей и клеев, суперабсорбентов. Существует несколько промышленных способов получения акриловой кислоты, среди них: гидролиз акрилонитрила до кислоты, гидролиз этиленциангидрина; гидрокарбокислирование ацетилена; парофазное окисление пропилена кислородом (O_2) на молибденовых, кобальтовых, висмутовых катализаторах с промежуточным образованием акролеина; гидролиз *n*-пропиолактона; окислительное карбонилирование этилена. Например, одностадийный процесс фирмы “STANDARD OIL” основан на прямом окислении пропилена кисло-

родом воздуха в присутствии водяного пара над молибденовисмутовым катализатором при 290–400°C и давлении 1–2 МПа. Выход акриловой кислоты при этом не превышает 70%, поскольку совмещение двух стадий с разными оптимальными условиями не способствует повышению селективности. Поэтому данный процесс проводят в две стадии, что представляет собой более экономичное и технологически гибкое решение. Крупнейшие производители акриловой кислоты — зарубежные компании “DOW”, “BASF”, “ARKEMA” и “NIPPON SHOKUBAI”. На российском рынке единственное предприятие ОАО “СИБУР-Нефтехим” производит акриловую кислоту в объеме 31 тыс. т в год.

Опишем кратко альтернативные биокаталитические способы получения акриламида и акриловой кислоты. Известны природные ферменты, которые могут быть активными компонентами гетерогенных БК для таких процессов: нитрилгидратаза (нитрилгидролаза, КФ 4.2.1.84), нитрилаза (нитриламиногидролаза, КФ 3.5.5.1) и амидаза (ациламидамидогидролаза, КФ 3.5.1.4). Нитрилгидратаза (НГ), ключевой фермент метаболизма нитрилов у микроорганизмов, катализирует реакцию гидратации нитрилов до амидов. Нитрилаза гидролизует нитрилы до карбоновых кислот. Амидаза гидролизует амиды в соответствующие карбоновые кислоты. Как видно из табл. 1, именно нитрилгидратаза является активным компонентом БК для промышленного производства акриламида из соответствующего нитрила. В России биотехнологический способ получения акриламида основан на использовании высокопродуктивных штаммов родококков *Rhodococcus rhodochrous* M8 и *R. rhodochrous* M20 [14]. Данный процесс реализован ЗАО “БИОАМИД” (Саратов, Россия, <http://www.bioamid.ru>) с участием БК М33 при 30°C.

Рассмотрим отечественные разработки гетерогенного процесса получения акриламида, выполненные научным коллективом сотрудников Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь) [15–17]. Для приготовления гетерогенных биокатализаторов авторы использовали нитрилгидратазу, выделенную из микроорганизмов *Rhodococcus ruber* gt1 из коллекции микроорганизмов этого Института. Для адсорбционной иммобилизации фермента были изучены следующие неорганические носители (табл. 3):

1) оксиды алюминия различных модификаций (α -, γ - Al_2O_3 производства ОАО “Катализатор”, Новосибирск) в виде колец, черенков, гранул;

2) зауглероженные носители ($\text{C}/\text{Al}_2\text{O}_3$), на поверхности которых был синтезирован слой каталитического волокнистого углерода (КВУ) путем высокотемпературного пиролиза водород-пропан-бутановой смеси на нанесенных Co-, Ni-катализаторах, как описано в [15];

Таблица 3. Характеристики неорганических носителей-адсорбентов и их адсорбционная способность, каталитические свойства иммобилизованной нитрилгидратазы

Носитель	Содержание С, мас. %	Удельная поверхность, м ² /г	Диаметр пор, нм	Величина адсорбции НГ*, мг/г	Активность БК, мкмоль мин ⁻¹ г ⁻¹	Удельная активность НГ**, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹	Сохранившаяся активность БК после 5-ти реакционных циклов, % от первоначальной	Ссылка	
α-Al ₂ O ₃	0	0.5	1400	5.6	162	29	5	[15, 16]	
	3.1	9	23	18.2	127	7	37		
α-Al ₂ O ₃	0	13	51	1.8	54	30	63		
	0.5	15	54	2.8	22	8	52		
γ-Al ₂ O ₃	0	246	8	2.0	36	18	23		
	2.5	206	8	17.2	34	2	27		
γ-Al ₂ O ₃ (СУМС®)	20	200	10	63.0	1890	30	10		
Сибунит®	99	440	18	45.6	456	10	30		
Активированный хитозан	44	н/о***	н/о***	0.5	300	150	1200		[17, 18]

* Условия адсорбции: 20 ± 2°С, начальная концентрация белка в растворе – 14 мг/мл, продолжительность адсорбции – 9 сут.

** Для сравнения: удельная активность НГ в растворе – 300 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹.

*** Не определено.

3) коммерческий пироуглеродсодержащий адсорбент марки СУМС®;

4) углеродный носитель марки Сибунит®;

5) хитозан, активированный 0.1% бензохиноном.

Анализ полученных результатов, представленных в табл. 3, показал следующее:

i) поскольку все изученные неорганические носители на основе Al₂O₃ являются мезопористыми (диаметр пор 10–50 нм), “скрытая” из-за диффузионных ограничений нитрилгидратазная активность была невелика;

ii) при зауглероживании оксидов алюминия (до 20 мас. % С) величина адсорбции НГ многократно (на порядок) увеличивалась. Так, максимальная величина адсорбции, равная 63 мг/г, наблюдалась при иммобилизации НГ на СУМС®;

iii) при синтезе КВУ на поверхности Al₂O₃ (до 3 мас. % С) активность БК уменьшалась в 1.5–2 раза;

iv) нитрилгидратаза, адсорбированная на незауглероженных (исходных) оксидах алюминия, проявляла удельную активность (A_{уд}) в 3–9 раз более высокую, чем НГ, адсорбированная на КВУ-содержащих адсорбентах;

v) на носителях марки СУМС® (20 мас. % С) и Сибунит (99% С), на поверхности которых присутствовал глобулярный пироуглерод, активности БК были сравнительно высокими, равными соответственно ~1900 и ~500 мкмоль мин⁻¹ г⁻¹ (табл. 3).

Наблюдаемая зависимость каталитических свойств иммобилизованной нитрилгидратазы от наноструктуры поверхностных углеродных отложений – углеродных нановолокон или глобулярного пироуглерода, являлась, безусловно, интересной. Из табл. 3 также следует, что при адсорбционной иммобилизации нитрилгидратаза сохранила не более 10% активности фермента в растворе, по-видимому, из-за деформационных искажений молекул НГ при взаимодействии с поверхностью неорганических носителей. С другой стороны, при иммобилизации на активированном хитозане НГ отношение A_{имм}/A_{р-р} составило около 50%, при этом величина удельной ферментативной активности, а также операционная стабильность БК были максимальными (табл. 3) [16, 17]. Кроме того, иммобилизация НГ на хитозане повышала термостабильность фермента при 70°С по сравнению с его гомогенным аналогом (ферментом в растворе). Дополнительно температурный оптимум (T_{опт}) реакции биоконверсии ацетонитрила сдвинулся на 5–15°С в область более высоких температур [17]. Интересно, что в течение первых 2–6 реакционных циклов наблюдалась выраженная активация БК: так, удельная активность иммобилизованной НГ возросла в 18 раз, с 9 до 160 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ (рис. 1) [17]. В последующих 50-ти циклах активность БК постепенно снижалась, однако и в 50-ом цикле превышала первоначальную активность БК в 3.5 раза (рис. 1). Авторы рассчитали, что в изученных условиях при многократном, в течение 50 циклов, исполь-

зовании приготовленного БК, содержащего 1.4 мг НГ, было получено 60 ммоль акриламида за 8.3 ч [17]. Продуктивность, оцененная из данных рис. 1, составила 4.5 т на 1 кг иммобилизованного фермента или 0.04 т на 1 кг БК. Биокатализатор, приготовленный иммобилизацией НГ на активированном хитозане, а также способ синтеза амидов, включая акриламид и никотинамид, с участием этого БК, были защищены патентом РФ [18]. Как описано в [18], трансформацию нитрилов проводили в водной или буферной среде pH 6–8 при 20–25°C в реакторе периодического действия. Начальная концентрация нитрила составляла 10 мас. %; после полной трансформации субстрата добавляли новую порцию нитрила. Выход акриламида, как показали расчеты, равен 4.3–6.4 т продукта на 1 кг фермента [18]. Продуктивность БК была оценена как 0.06 т на 1 кг БК.

Для приготовления БК с активностью нитрилазы авторы применяли фермент, выделенный из *Pseudomonas fluorescens* С2, иммобилизацию которого проводили на хитозане [19]. Активация хитозана бензохиноном привела к изменению биокаталитических свойств иммобилизованного фермента: удельная активность нитрилазы возросла в 2–3 раза, операционная стабильность также увеличилась [19]. С участием БК, приготовленных иммобилизацией нитрилазы на немодифицированном и активированном хитозане, за 312 ч их работы при 22°C в течение нескольких десятков циклов авторы получили соответственно 19 и 70 мг акриловой кислоты на 1 мг фермента [19]. Продуктивность такого БК по оценкам была достаточно низкой и не превышала 0.1 т на 1 кг фермента, что в 50 раз ниже продуктивности иммобилизованной НГ, дающей в среднем 5 т продукта на 1 кг фермента, как описано выше.

Для приготовления БК с активностью амидазы авторы использовали фермент, выделенный из *R. rhodochrous* 4-1 [20]. Иммобилизацию проводили адсорбцией амидазы на неорганических носителях марок СУМС® и Сибунит®, а также путем ковалентного связывания фермента с

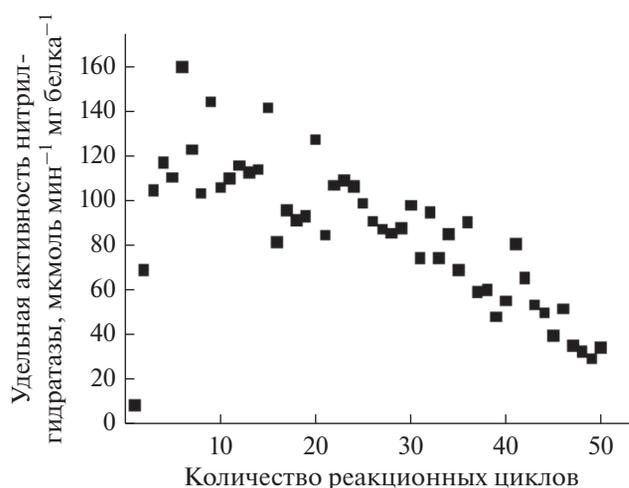


Рис. 1. Операционная стабильность нитрилгидратазы, иммобилизованной на активированном хитозане. Условия реакции: 22°C, 0.58 М раствор акрилонитрила, калий фосфатный буфер, pH 7.2 ± 0.2, продолжительность реакционного цикла – 10 мин (с разрешения авторов [17]).

активированным хитозаном или образованием в отсутствие носителя агрегатов фермента, поперечно сшитых с помощью глутарового диальдегида или бензохинона во время высаливания белка сульфатом аммония [20]. Как видно из табл. 4, амидаза, иммобилизованная на активированном хитозане, обладала активностью, составляющей 50–60% от величины A_{p-p} , отличалась повышенной термостабильностью и сохранила более 20% первоначальной активности после 5 реакционных циклов продолжительностью 24 ч каждый. Расчет показал, что с участием этого БК в результате конверсии 0.05 М акриламида в течение 144 ч было получено 30 мг акриловой кислоты на 1 мг фермента [20].

В настоящее время авторы проводят исследования по разработке целноклеточных гетерогенных БК, приготовленных иммобилизацией клеток микроорганизмов *Rhodococcus* sp., обладаю-

Таблица 4. Активность иммобилизованной амидазы в зависимости от способа приготовления БК [20]

Носитель	Способ иммобилизации амидазы	Удельная активность фермента*, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹	Активности, сохранившейся после иммобилизации, %
СУМС®	Адсорбция	0.83	20
Сибунит®	Адсорбция	1.18	28
Хитозан активированный	Ковалентное связывание	2.50	60
Отсутствует	Поперечная сшивка глутаровым диальдегидом	1.34	32
Отсутствует	Поперечная сшивка бензохиноном	0.44	10

* Для сравнения: удельная активность амидазы в растворе – 4.17 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹.

щих высокой НГ-активностью, на углеродных носителях, в том числе на основе наноструктурированного углерода. Данные целлюлозные БК защищены патентами РФ [21, 22], однако описание этих биокатализаторов и условий процесса получения амидов находится вне темы данного обзора.

ЧАСТЬ 2. СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

2.1. Биодизель

Биодизелем называют смесь метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), входящих в состав растительных масел, образовавшихся в процессе метанолиза триглицеридов. В качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания используют как чистый биодизель (обозначается как В100), так и его смеси в любых пропорциях с традиционным углеводородным дизельным топливом. Наиболее распространенной маркой является топливо В20, в составе которого 20% приходится на биодизель, 80% – на дизель (цифра после буквы В обозначает процентное содержание биодизеля). При применении смесей В5–В20 не требуется технических изменений в двигателях внутреннего сгорания, поскольку они имеют очень близкие к дизельному топливу физико-химические показатели (вязкость, теплотворность). Технологии гомогенного процесса получения биодизеля из растительного масла с участием едкого кали в качестве катализатора сравнительно просты и описаны в Интернете (например, биодизель своими руками в домашних условиях, <https://cotlix.com/proizvodstvo-biodizelya-v-domashnix-usloviyax>). Мини-заводы по производству биодизеля продаются и могут быть установлены не только на сельскохозяйственных предприятиях, но и вблизи крупных ресторанных комплексов, отходами которых являются использованные растительные масла и фри-туры. Процесс метанолиза (реже этанолиза) растительного масла производят при 60°C и 1 бар в присутствии катализатора – гидроксида калия или натрия. Легкие верхние фракции содержат эфиры жирных кислот (биодизель), нижние фракции, называемые глицериновой фазой, – глицерин, метанол и щелочь. Глицериновая фаза представляет серьезную проблему с точки зрения ее утилизации из-за высокой щелочности и содержания токсичного метанола. Основным технологическим показателем процесса получения дизеля – выход метиловых эфиров жирных кислот, который должен быть не ниже 96%. Следует отметить, что необходима тщательная очистка (промывание) эфиров от продуктов омыления жирных кислот щелочью, а также от токсичного метанола. Обязательной стадией является “сушка” биодизеля, так как вода приводит к микробиологическому заражению и образованию жирных кислот,

вызывающих коррозию металлических деталей. Срок хранения биодизеля не превышает 3 мес.

Обзор [23], содержащий 272 ссылки, посвящен современному состоянию и перспективам производства биодизеля. Описаны современные технологии химической и биокаталитической переэтерификации и алкохолиза триглицеридов растительных масел и их отходов. Основное внимание уделено катализаторам химической природы: гетерогенным кислотнo-основным на основе наненных оксидов металлов, таких как CaO/SiO₂, Fe₂O₃/CaO, Fe₂O₃/KOH, KF/CaO-Fe₃O₄; индивидуальным соединениям CaSn(OH)₆ и BaAl₂O₄ (приведены 19 примеров). Например, практически полная конверсия триглицеридов (99%) достигается при метанолизе рапсового и соевого масел на катализаторах Na/Al-SBA-15 за 6 ч при 65°C или CaO@γ-Fe₂O₃ за 3 ч при 70°C [23]. Более глубокий анализ гетерогенных биокаталитических процессов получения биодизеля проведен в работе [24].

Первый биокаталитический процесс метанолиза отработанных пищевых масел мощностью 10 тыс. тонн был реализован в периодическом режиме в 2007 г. Гетерогенный биокатализатор для него был приготовлен путем иммобилизации липазы из *Candida* sp. [25]. В настоящее время интенсивные исследования процессов ферментативной переэтерификации триглицеридов растительных масел в эфиры жирных кислот продолжаются; в них используют термостабильные рекомбинантные (генно-инженерные) липазы как в растворе, так и в иммобилизованном состоянии. В литературе [23–29] достаточно подробно описаны свойства БК, в том числе коммерческих Novozyme[®] 435, Lipozyme[®], а также технологические характеристики процесса производства биодизеля (табл. 5). Внимание уделяется следующим вопросам:

- 1) исходное сырье (масло) и условия его биоконверсии (температура, соотношение реагентов, органический растворитель);
- 2) реакторы и режимы проведения процесса (периодический, непрерывный);
- 3) побочные продукты и способы их утилизации (табл. 5).

В работе [30] описан процесс получения нового продукта под названием “Экодизель”, представляющего собой смесь этиловых эфиров жирных кислот с моноглицеридами масла и этанолом, путем этанолиза подсолнечного масла с участием гетерогенных БК, приготовленных адсорбцией коммерческой липазы В из *Candida antarctica*. Выход Экодизеля составил 80% за 3 ч при 30°C [30]. Экодизель, аналогично биодизелю, смешивается с традиционным дизелем в любых пропорциях и используется как компонент горючего для двигателей внутреннего сгорания. Ис-

Таблица 5. Сравнительная характеристика низкотемпературных (не выше 50°C) биокаталитических процессов получения биодизеля путем метанолиза растительных масел, включая отходы от приготовления пищи

Биокатализатор	Исходное сырье	Скорость образования МЭЖК, г л ⁻¹ ч ⁻¹	Максимальный выход МЭЖК в оптимальных условиях, %, за x ч
Цельно-клеточный на основе химерной <i>P. pastoris</i>	Соевое масло рафинированное	37.7	94% за 12 ч
	Кукурузное масло рафинированное	37.8	95% за 12 ч
	Канализационное масло	43.8	91% за 10 ч
Lipozyme® TL IM	Соевое масло рафинированное	61.9	98% за 12 ч
	Кукурузное масло рафинированное	39.3	86% за 12 ч
	Подсолнечное масло рафинированное	89.9	83% за 7 ч
Novozyme® 435	Соевое масло рафинированное	14.2	97% за 15 ч
	Кукурузное масло рафинированное	11.7	94% за 45 ч
	Подсолнечное масло рафинированное	15.8	99% за 50 ч
Lipozyme® TL IM + Novozyme® 435	Отходы от жарки	63.2	100% за 12 ч
	Отходы от приготовления пищи	38.0	83.5% за 10 ч
	Отработанное масло	36.0	95% за 12 ч

следования операционной стабильности в большинстве работ ограничивались 5–10 реакционными циклами, в течение которых БК сохраняли не менее 80% первоначальной активности. В работе [24] было осуществлено 20 реакционных циклов, при этом БК сохранил 85–90% первоначальной активности (это лучший результат).

Хорошо известно, что метанол и этанол инактивируют практически все известные жизненно важные ферменты, в том числе липазы, поэтому для достижения высокой степени конверсии триглицеридов эти спирты добавляют в реакционные среды постепенно, небольшими порциями после их полного превращения. Авторы [28, 30] вместо низших спиртов использовали менее токсичные метил- или этилацетаты, и исследовали параметры процесса переэтерификации растительного (подсолнечного, касторового) масла с применением вышеуказанных доноров ацила. Результаты работы [28] описаны ниже. В [30] было показано, что биокатализатор Lipozyme® TL IM в изученных условиях обладал сравнительно высокой активностью: максимальный выход МЭЖК составил 70 ± 2% при 40–60°C; кроме того, БК не терял активности в течение 5 реакционных циклов продолжительностью 24 ч каждый. Следует отметить, что образующиеся в данном процессе различные ацилпроизводные глицерина являются также ценными рыночными продуктами с высокой потребительской стоимостью. Например, моно- и триацилпроизводные глицерина используют в качестве топливной добавки для улучшения эксплуатационных свойств биодизеля и бензина, ацетаты глицерина входят в состав отвердителей. Триацилглицерин (триацетин)

широко применяют в пищевой промышленности благодаря его влагоудерживающим свойствам, а также в табачной промышленности для пропитки сигаретных фильтров.

В России систематические исследования процессов получения биодизеля из растительных масел не проводились и не проводятся, поскольку считается, что для России вопрос использования биодизеля в качестве добавки к традиционному дизелю не актуален. В настоящем обзоре описаны результаты немногочисленных публикаций.

Научно-исследовательские работы были выполнены в Российском государственном университете нефти и газа им. И.М. Губкина. В [31] изучен процесс метанолиза триглицеридов жирных кислот растительного масла с участием БК двух типов, приготовленными как на основе иммобилизованных клеток *Yarrowia lipolytica* (цельноклеточный БК), так и на основе липазы – фермента, выделенного из *S. antarctica* (ферментный БК). Процесс проводили в периодическом режиме при 25°C со ступенчатым добавлением метанола. Выход МЭЖК составил 27% (за 72 ч) и 21% (за 24 ч) соответственно для указанных БК. Следует учесть, что продолжительность процесса с участием цельноклеточного БК и его содержание в реакционной среде были в 3 раза выше [31]. Компонентный состав продуктов метанолиза с использованием БК двух типов значительно различался между собой: так, для цельноклеточного БК было обнаружено значительно количество моноацилглицеридов (38%), для ферментного БК – содержание свободных жирных кислот составило ~14%, что недопустимо для биодизеля. Авторы [31] сделали вывод о том, что БК, полу-

ченные иммобилизацией клеток микроорганизмов-продуцентов липазы, эффективнее с экономической точки зрения, поскольку характеризуются более высокой конверсией триглицеридов, а также менее затратной и трудоемкой процедурой их приготовления из-за отсутствия сложных и дорогостоящих стадий выделения и очистки ферментов. В работе [32] авторы описали свойства цельноклеточного БК, полученного путем включения мицелия плесени *Aspergillus niger* в полиуретановую пену. Метанолиз подсолнечного масла проводили в реакторе с неподвижным слоем биокатализатора. В изученных условиях максимальный выход метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля) составил 23% при 28°C [32].

В работе [33] сотрудниками Института катализа (ИК) СО РАН был приготовлен ферментный биокатализатор путем ковалентного связывания рекомбинантной липазы из *Geobacillus stearothermophilus* G3, сконструированной авторами методами генетической инженерии, с мезопористым аминированным силикагелем, активированным глутаровым диальдегидом. Метанолиз подсолнечного масла осуществляли в периодическом режиме при 40°C в присутствии *трет*-бутанола, содержание БК в реакционной среде – 20 мас. %. В изученных условиях выход МЭЖК был равен 43% за 96 ч. БК сохранил 52% первоначальной активности после 20 реакционных циклов, расчетное время полуинактивации составило 477 ч. БК защищен патентом РФ [34], однако следует отметить, что данный биокатализатор не удовлетворяет требованиям к коммерческому БК, описанным выше, прежде всего, имеет высокую стоимость.

Авторы работы [28], также сотрудники ИК СО РАН, разработали гетерогенный БК для получения эфиров ЖК путем переэтерификации растительных (подсолнечного, льняного) масел с участием метил- или этилацетата. Описанный в [35] оригинальный метод иммобилизации ФАС путем “замуровывания” в ксерогель диоксида кремния микробиальной биомассы одновременно с некоторыми функциональными реагентами, например, активаторами ферментов, был специально придуман для приготовления цельноклеточных БК на основе микроорганизмов, практически не способных к адгезии на твердых поверхностях. Активным компонентом БК для получения биодизеля были полностью разрушенные клетки (лизаты) рекомбинантного (генно-инженерного) штамма-продуцента липазы *E. coli/lip*, специально сконструированного и подробно описанного в работе [36]. Приготовленные цельноклеточные БК представляли собой органо-минеральные (гибридные) композиты, обладающие ферментативной активностью. Минеральной (неорганической) матрицей являлся ксерогель диоксида кремния, образующийся при высушивании SiO₂-гидрогеля, образовавшегося в результате протекания

золь–гель процессов в растворах силиката натрия; органическим компонентом – биомасса из лизатов *E. coli/lip* и влагоудерживающий агент (мальтодекстрины). Выбор оптимального состава таких многокомпонентных БК осуществляли при одновременном выполнении следующих основных условий: во-первых, достижение максимальной биокаталитической активности в условиях реакции переэтерификации в безводных средах (с содержанием 0.1–1% H₂O); во-вторых, приготовление гранул БК с высокой механической прочностью, обеспечивающей стабильную работу БК в условиях реакционной среды. Этим требованиям удовлетворял следующий состав (мас. % по сухим веществам): SiO₂ – не менее 20; биомасса из лизатов *E. coli/lip* – не более 40; мальтодекстрины – не менее 10 [28].

Процесс получения биодизеля – этиловых эфиров жирных кислот (ЭЭЖК) – с участием приготовленных БК проводили в периодическом и непрерывных режимах путем переэтерификации подсолнечного масла и этилацетата в гексане при 40°C [28]. Хроматографический анализ продуктов реакции показал, что в данной реакции образовывались этиловые эфиры пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот, входящих в состав растительного масла. В оптимальных условиях непрерывного процесса в реакторе с неподвижным слоем БК максимальная конверсия триглицеридов в ЭЭЖК была равна 60% при времени контакта 3.5 ч и мольном соотношении масла и этилацетата 1 : (15–20) [28]. Время полуинактивации приготовленных БК в условиях периодического процесса составило 720 ч (рис. 2) [28]. Продуктивность БК, оцененная на основе экспериментальных результатов, составила не менее 3 т биодизеля на 1 кг БК. Биокатализатор с оптимальным составом, способ его приготовления и способ ферментативной переэтерификации растительных масел защищены патентом РФ [37].

Следует еще раз отметить, что в РФ систематические исследования по разработке коммерческих БК для получения биодизеля из растительных масел не проводились. В литературе представлены единичные научно-исследовательские работы в этой области, выполненные в разных организациях, в том числе в НИЦ “Курчатовский институт” [38, 39].

2.2. Сложные эфиры

Синтез сложных эфиров (СЭ) карбоновых кислот, в том числе насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот (ЖК) протекает в процессе их этерификации спиртами. Сложные эфиры используют в качестве душистых веществ, разнообразных отдушек, а также смягчающих и поверхностно-активных (ПАВ) компонентов, востребо-

ванных в пищевой, парфюмерной и косметической промышленности [5, 40–42]. Сложные эфиры ЖК с многоатомными спиртами, например, этиленгликолем и полиэтиленгликолем, применяют как ПАВ и *присадки к моторным маслам*. Эфиры жирных кислот с углеводами (глюкозой, фруктозой, маннозой, арабинозой) нашли употребление как подсластители и неионные, биodeградируемые, нетоксичные сурфактанты, кроме того, данные эфиры обладают выраженным противомикробным действием, что позволяет использовать их в медицине [5, 43–45]. В табл. 6 приведены примеры сложных эфиров *душистых веществ* и соответствующие им запахи [41, 42]. Следует отметить, что рынок душистых веществ и ароматизаторов, оцененный в 2019 г., составлял 28 \$ млрд. Ожидается, что совокупный годовой темп его роста с 2021 по 2027 г. будет 4.7% (до 35 \$ млрд) (Flavors and Fragrance Market Size, Share & Trends Forecast by 2027, <https://www.alliedmarketresearch.com/flavors-and-fragrances-market>).

В настоящее время сложные эфиры как ценные продукты органического синтеза получают преимущественно, традиционными химическими методами с применением сильных кислот в качестве катализаторов. Известны также гетерогенные катализаторы, например, модифицированные $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ и $\text{MoO}_3/\text{SnO}_2$, позволяющие синтезировать метиловые эфиры жирных кислот с выходом 80–90% при повышенных температурах (120–160°C) [46]. Биокаталитические “зеленые” процессы синтеза разнообразных СЭ, основанные на использовании фермента липазы в качестве активного компонента БК, описаны в обзоре [44, 47–51].

Первые исследования возможности катализа липазами реакций синтеза сложных эфиров в практически безводных средах органических растворителей были проведены в 1990-х гг., и их результаты опубликованы в [52–55]. В работах [52–54] липазы применяли в виде порошков лиофильно высушенных ферментов, которые добавляли в среды, содержащие два субстрата (кислоту, S_1 , и спирт, S_2) в органическом растворителе (гексан, толуол, дихлорэтан, простые эфиры). Согласно результатам одной из первых работ [54] по этерификации каприновой (декановой C_{10}) кислоты додеканолом (C_{12}) с помощью микробных липаз, выделенных из *Rhizopus miehei* и *S. rugosa*, при увеличении активности воды (a_w) в гексане скорость реакции этерификации возрастала в 2–10 раз. В работе [55] был приготовлен БК путем адсорбционной иммобилизации липазы из *S. rugosa* на макропористом полипропилене марки Accurel EP100K. Авторы определили кинетические параметры, такие как максимальная скорость реакции (V_{\max}) и константы Михаэлиса (K_M), а также специфичность биокатализа в реакции этерификации

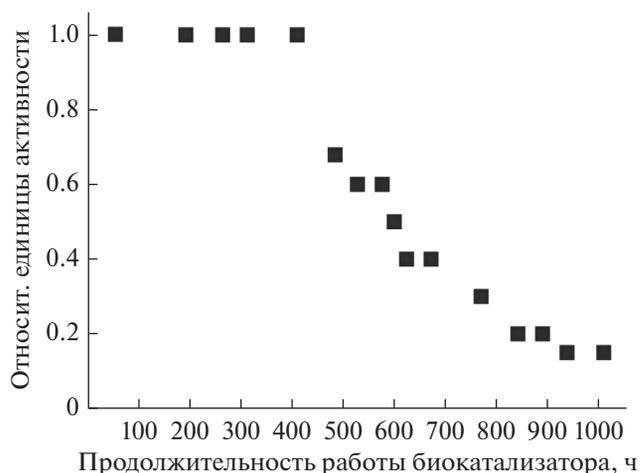


Рис. 2. Стабильность БК в реакции этерификации подсолнечного масла и этилацетата. Условия реакции: 40°C, 0.1 М масло, 2.3 М этилацетат, гексан, реактор смешения, скорость перемешивания — 150 об./мин. Продолжительность каждого реакционного цикла — 5 ч.

ции ЖК сулкатолом (*R*-, *S*-6-метил-5-гептен-2-ол), протекающей в толуоле при оптимальной активности воды ($a_w = 0.76$). Было показано, что величина V_{\max} (мкмоль $\text{с}^{-1} \text{кг}^{-1}$) уменьшалась в ряду кислот: C_{12} (112) > C_{10} (94) > C_8 > $C_4 \sim C_{14}$ (33) > C_{16} (21) > C_{18} (12) \gg C_6 (2). При этом максимальное сродство в субстрату-кислоте, характеризующееся величиной K_M , наблюдалось для масляной (C_4) и капроновой (C_6) кислот (0.0039 и 0.0143 моль л^{-1} соответственно), минимальное — для лауриновой (C_{12}), миристиновой (C_{14}) и пальмитиновой (C_{16}) кислот (0.492, 0.745 и 0.415 моль л^{-1} соответственно). Удивительно, что липазы проявляют свои уникальные каталитические свойства не только в органических растворителях, но и в суперкритических условиях CO_2 при давлении 13–18 МПа [56].

Очевидно, что отделение тонкодисперсных порошков лиофилизированных ферментов из реакционных сред, содержащих летучие вещества (эфиры, спирт, растворители) путем фильтрации или центрифугирования представляло определенные трудности. Приготовление гетерогенных БК путем иммобилизации липаз на гранулированных носителях позволяло легко решить данную проблему, а также организовать процесс производства ценного конечного продукта — сложного эфира — в реакторах непрерывного и периодического действия. В настоящее время гетерогенные БК, обладающие активностью липазы, в том числе производимые ведущей компанией “NOVO” (“Novozyme”), торговых марок Novozym® и Lypozyme® активно исследуются в низкотемпературных “зеленых” процессах синтеза разнообразных сложных эфиров.

Таблица 6. Душистые вещества на основе сложных эфиров, их запахи и области применения

Эфир (C_x – количество атомов углерода в кислоте)	Запах	Область применения
Этиловые эфиры		
Этилпропионат (C_3)	Фруктовый (спелое яблоко)	Пищевая промышленность (напитки, сиропы)
Этилбутират (C_4)	Фруктовый (ананас, маракуйя, свежее красное яблоко, клубника)	
Этилпентаноат (C_5)	Анисовое семя	
Этилгексаноат (C_6)	Спелые ягоды	
Этилгептаноат (C_7)	Спелый виноград	
Этилоктаноат (C_8)	Кокосовый	
Этиллаурат (C_{12})	Фруктово-цветочный	Товары бытовой химии (мыло, синтетическое моющее средство)
Этилбензоат	Фруктовый	Товары бытовой химии (цветочное мыло)
Бутиловые эфиры		
Бутилбутират (C_4)	Ананас	Пищевая промышленность (напитки, сиропы)
<i>изо</i> -Бутилгексаноат (C_6)	фруктово-винный аромат с ноткой ананаса	
<i>n</i> -Бутилгексаноат (C_6)	Фруктовый	
Бутилбензоат	Амбра	Парфюмерия (цветочные букеты)
Другие		
<i>изо</i> -Пентилпропионат (C_3)	Фруктовый (груша, ананас)	Пищевая промышленность Парфюмерия
Гексилгексаноат (C_6)	Свежая зелень	
Аллилгексаноат (C_6)	Сильный фруктовый аромат ананаса с жирной ноткой и оттенком рома	
Децилацетат (C_2)	Грушевый	

Работы по изучению реакций этерификации с использованием липаз были начаты в 1990-х гг. в Казанском государственном технологическом университете (КГТУ, сейчас – ФГБОУ ВО КНИТУ). В настоящем обзоре приведена полная библиография публикаций этого коллектива. Авторами-преподавателями КНИТУ разработана методика ферментативного синтеза СЭ, вошедшая в учебное пособие “Ферменты. Лабораторный практикум” [57]. Пособие было передано на выставку учебной литературы в Париже, награждено дипломом Европейской научно-промышленной палаты и золотой медалью “За выдающиеся достижения”.

Впервые в 1998 г. проведен синтез эфиров лауриновой (C_{12}) и пальмитиновой (C_{16}) жирных кислот с деканолом (C_{10}) в неводных средах (гексан, октан) с помощью панкреатической липазы (ПЛ), выделенной из печени крупного рогатого скота и лиофильно высушенной [58]. В результате были

получены дециловые эфиры высших жирных с выходом 72–78% за 24–48 ч при 25°C (табл. 7). В дальнейшем (до 2020 г.) научный коллектив проводил систематические исследования реакций этерификации, катализируемых ПЛ, публикуя свои результаты в вестниках университетов [59–67], затем в журнале “Катализ в промышленности” [68–71]. Обзорная статья [71], содержащая 85 ссылок, также включает полную библиографию (15 ссылок) работ этого коллектива (рук. Гамаюрова В.С.). Здесь же представлена информация о механизме катализа липазами. В табл. 7 приведены лучшие результаты научно-исследовательских работ научного коллектива КНИТУ, выбранные по максимальной достигнутой конверсии кислоты (выхода эфира, %) в течение одного реакционного цикла с известной продолжительностью (ч). Эти данные позволяют приблизительно оценить скорость реакции ферментативной этерификации и

Таблица 7. Параметры реакции синтеза некоторых сложных эфиров не иммобилизованными липазами

Кислота S ₁	Спирт S ₂	Мольное отношение S ₁ : S ₂	Максимальный выход эфира, % (условия реакции: T, °C, продолжительность цикла), растворитель	Ссылка
Лауриновая (C ₁₂)	Деканол (C ₁₀)	1 : 1.5	78% (25°C, 24 ч), гексан	[58]
Валериановая (C ₅)	<i>изо</i> -Пентанол (C ₅) (изоамиловый спирт)	1 : 4	94% (30°C, 24 ч), гексан	[59]
Лауриновая (C ₁₂)	Этанол (C ₂)	1 : 4	83% (32°C, 24 ч), гексан	[60]
Лауриновая (C ₁₂)	1,4-Бутиленгликоль	1 : 5	78% (30°C, 24 ч), гексан	[62]
Масляная (C ₄)	Бензиловый спирт	1 : 1.5	91% (30°C, 24 ч), гексан	[64]
Лауриновая (C ₁₂)	Цетиловый (C ₁₆) спирт	1 : 2	78% (30°C, 24 ч), гексан	[68]
Каприновая (C ₁₀)	ПЭГ-400	1 : 1.8	80% (25°C, 48 ч), гексан : бензол = 3 : 2	[69]
Масляная (C ₄)	Сивушное масло	1 : 2.5	94% (30°C, 24 ч), гексан	[70]
Масляная (C ₄)	Бутанол (C ₄)	1 : 2	93% (30°C, 24 ч), гексан	[72]
Капроновая (C ₆)	Сивушное масло <i>изо</i> -пентанол (C ₅)	1 : 5	87% (30°C, 24 ч), гексан	[63]

активность БК. Еще раз следует подчеркнуть, что авторы в качестве БК изучали не иммобилизованные липазы, а использовали либо сухие порошки лиофильно высушенной ПЛ II, либо жидкий раствор коммерческой липазы Lipozyme® CALB (Novozymes).

В работах [60, 68] было исследовано влияние природы органических растворителей и их смесей на скорость реакции этерификации. Показано, что в большинстве случаев максимальная скорость синтеза сложного эфира наблюдается в гексане. Смешение гексана с бензолом или диэтиловым эфиром (ДЭЭ) снижает в 2 раза выход СЭ лауриновой (C₁₂) кислоты как с бутиленгликолем, так и с цетиловым (C₁₆) спиртом. Для синтеза ценных пентиловых СЭ авторы предложили применять отходы спиртового производства – сивушные масла, в которых содержание С₅-спиртов (в основном *изо*-пентанола) составляет 73–87%, *изо*-бутанола – 9–12%, *н*-пропанола – до 9%, этанола – до 4.5%. Пентиловые эфиры масляной (C₄) и капроновой (C₆) кислот образовывались с высоким выходом (90%) [63, 70].

Исследования по субстратной специфичности панкреатической липазы в реакциях этерификации жирных кислот и их результаты описаны практически во всех работах авторов. В [59, 60] сравнили скорости реакции этерификации при использовании в качестве субстрата-кислоты (S₁) уксусную (C₂), пропионовую (C₃), валериановую (C₅), лауриновую (C₁₂), бензойную, салициловую и абетиновую кислоты, а качестве субстрата-спирта (S₂) этиловый (C₂), бутиловый (C₄) и изоамиловый (C₅) спирты. Было показано, что в среде органического растворителя – смеси гексана с диэтиловым эфи-

ром в соотношении 1 : 1 – выходы эфиров изоамилового спирта (%) за 24 ч при 30°C имели следующие значения: валериат (72%) > абиеат (56%) > салицилат (40%) > пропионат (36%) ~ бензоат (35%) [59]. Выход эфиров масляной кислоты, синтезируемых в гексане, уменьшался при увеличении длины углеродного скелета субстрата-спирта от C₄ до C₁₁; максимальный выход наблюдался в реакции синтеза бутилбутирата (СЭ масляной (C₄) кислоты и бутилового (C₄) спирта) [72]. При получении эфиров масляной (C₄) кислоты авторы построили следующий ряд снижения скорости этерификации в зависимости от природы спиртового субстрата: *н*-C₄ > *н*-C₅ > *изо*-C₅ > *изо*-C₄ > C₈ > C₁₁. Если в реакции использовали бензиловый спирт и жидкий Lipozyme® CALB, то скорость образования эфира падала в ряду кислот: C₂ > C₃ > C₄ ≈ C₅ > C₈ [73]. В работах [62, 69] была поставлена задача низкотемпературного ферментативного синтеза разнообразных СЭ жирных кислот с участием полиолов, в том числе полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400 (ПЭГ-400) (табл. 7).

Как отмечалось выше, авторы исследовали реакции этерификации различных насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот в безводных средах органических растворителей (гексане, бензоле) и их смесях с применением в качестве БК коммерческой лиофильно высушенной ПЛ в порошкообразном виде. Панкреатическая липаза, иммобилизованная путем включения фермента в агаровый гель, была также изучена в реакциях ферментативной этерификации [61]. Сравнение активности двух БК – липазы в порошкообразном и в иммобилизованном состоянии, проведенное в одинаковых условиях синтеза изоамилового валериата в гексане при 30°C, показало, что им-

мобилизованная липаза была в 6 раз активнее по сравнению с порошком ПЛ [61], однако работы в этом направлении продолжены не были. Исследования операционной стабильности приготовленных БК немногочисленны. Так, в [66] найдено, что в течение 5–8 реакционных циклов степень конверсии масляной кислоты в реакции синтеза бутилбутирата при 35°C в гексане уменьшилась незначительно, в пределах 5–15%.

В работах коллектива [58–70] установлено, что панкреатическая липаза, а также ферменты, приобретенные в компании NOVO (Novozyme 868 и 398, Lipozyme CALB) были активны и обладали широкой субстратной специфичностью в реакции этерификации, что позволило синтезировать различные сложные эфиры, в том числе душистые соединения, востребованные на рынке. Авторы сообщили, что в настоящее время ими подана заявка на патент РФ [74], в которой описан ферментативный способ получения ди-(2-этилгексилового) эфира азелаиновой кислоты (двухосновной нонандиовой кислоты $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$).

В 2012 г. в ИК СО РАН были начаты научно-практические исследования, продолжающиеся и по сей день, основная цель которых состоит в разработке активных и стабильных гетерогенных БК для биоконверсии триглицеридов в ценные продукты, образующиеся в результате гидролиза и переэтерификации, в том числе высокотемпературной (70–75°C) переэтерификации масло-жировых смесей (пищевые ингредиенты с заданными свойствами (пластичность, температура плавления, отсутствие *транс*-изомеров ЖК) [75] и низкотемпературной (20–40°C) переэтерификации триглицеридов растительных масел с участием этилацетата в ЭЭЖК (биодизель, витамин F) [28, 76]. Приготовленные БК и их каталитические свойства были также систематически изучены в реакциях этерификации насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот C_4 – C_{18} алифатическими спиртами C_2 – C_{16} .

Для выполнения работ в области современного гетерогенного биокатализа был создан временный научный трудовой коллектив (НТК), в который входили не только химики, но и специалисты в области генетической инженерии и молекулярной биологии (рук. д.б.н. Беклемишев А.Б.). Активным компонентом всех разработанных гетерогенных БК является иммобилизованная рекомбинантная липаза из термофильного микроорганизма *Thermomyces lanuginosus*. Участники сформированного НТК в результате генно-инженерных манипуляций специально конструировали рекомбинантные штаммы-продуценты липазы из *T. lanuginosus* на основе следующих микроорганизмов: 1) клеток кишечной палочки *E. coli*, продуцирующих **внутри**клеточную мембранно-связанную липазу (обознач. *rE. coli/lip*), и 2) метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* (в н/в *Komagataella phaffii*),

продуцирующих **внеклеточную** термостабильную липазу, секретируемую в питательную среду во время роста микроорганизмов (обознач. *rPichia/lip*). Итоги этой многолетней генно-инженерной работы опубликованы сравнительно недавно [36]. Поскольку тема представленного обзора относится к приготовлению и описанию ферментных (а не цельноклеточных) гетерогенных БК, то есть, как отмечалось выше, полученных на основе иммобилизованных частично очищенных ферментов, то подробнее опишем результаты исследований двух БК, защищенных патентами РФ, с рабочими названиями ЛипоСил и ЛипоКарб.

ЛипоСил (LipoSil) – БК для проведения ферментативного низкотемпературного синтеза сложных эфиров, приготовленный путем принудительной адсорбции рекомбинантной липазы *rPichia/lip* на поверхности коммерческого мезопористого силикагеля марки КСК-Г, защищен патентом РФ [77]. Каталитические свойства ЛипоСил, такие как этерифицирующая активность, субстратная специфичность и операционная стабильность обсуждаются в работах [78–82].

ЛипоКарб (LipoCarb) – БК, полученный путем физической (спонтанной) адсорбции липазы *rPichia/lip* на макропористом углеродном аэрогеле (МУА, разработан в ИК СО РАН), защищен патентом РФ [83]. Каталитические свойства этого БК описаны в [82, 84–88].

Процесс ферментативной этерификации, как отмечалось выше, протекает в среде неводных органических растворителей или их смесей, поэтому выбор оптимального состава реакционной среды является важной научно-практической и далеко не простой задачей, от решения которой зависят основные параметры процесса, такие как скорость реакции и выход продукта, а также стабильность БК. В настоящее время оптимизацию условий этерификации осуществляют, как правило, на основе экспериментального опыта в формате “смешивай и тестируй”. В работе [89] были сформулированы критерии, которым должен соответствовать подходящий для биокатализа органический растворитель, в котором происходит ферментативная реакция:

- 1) достоверно измеряемая конверсия субстрата в продукт (не ниже 5%);
- 2) субстраты и продукты хорошо растворяются в реакционной среде;
- 3) необходимое для биокатализа водное окружение фермента не разрушается;
- 4) органический растворитель с низкой токсичностью, также важны высокая доступность и относительно низкая стоимость;
- 5) отсутствуют трудности выделения продуктов реакции из смеси; желательна рекуперация растворителя и повторное его использование в последующих реакционных циклах.

В работе [89] предложен компьютерный алгоритм выбора оптимального растворителя специально для биокатализа, а именно САМД-методология (Computer-Aided Molecular Design). Дополнительно в программе были учтены следующие факторы: 1) равновесие реакции, 2) оптимальная взаимная растворимость в системе “вода/растворитель”, 3) наличие структурной совместимости в смесях органических соединений – двухфазные смеси не образуются. Систематический подход и оптимизация алгоритма выбора растворителя основаны на выполнении и достижении основных практически важных целевых показателей, таких как максимальный выход целевого продукта за минимальное время и/или максимальная продуктивность БК, прежде всего, за счет его высокой операционной стабильности. Было предсказано и затем экспериментально подтверждено, что неполярные растворители, в отличие от полярных, наиболее предпочтительны для проведения ферментативных реакций переэтерификации и этерификации. На примере реакции этерификации акриловой кислоты (C_3 , $CH_2=CH-COOH$) октанолом (C_8) с участием липазы В из *Candida antarctica* в составе коммерческого БК Novozyme® 435, проводимой в средах восьми изученных растворителей, было установлено, что максимальная скорость наблюдается в неполярных растворителях, таких как циклогексан ($40 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$) и изооктан ($25 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$), затем толуол ($10 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$) [89]. В полярных растворителях, таких как диизопропиловый и метил-*трет*-бутиловый спирты, скорость реакции этерификации составила $3-4 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$, в 2-бутаноне и ацетоне реакция не протекала. Характеристикой полярности органических соединений, в том числе растворителей, является значение десятичного логарифма коэффициента распределения в двухфазной системе вода/октанол ($\log P$). Авторы работы [90] исследовали 7 (семь) растворителей с различной полярностью и значением $\log P$ от 0.6 до 4.4 и установили, что максимальная конверсия 1-(4-(трифторметил)фенил)этанола и энантиомерный избыток его *S*-изомера, полученного в результате реакции переэтерификации с винилацетатом с помощью липазы PS из *Pseudomonas cepacia*, наблюдался в неполярных растворителях, таких как изооктан и гексан, минимальные показатели – в полярном 1,2-дихлорэтаноле и метил-*трет*-бутиловом эфире. Как показал анализ литературы, в настоящее время накопление экспериментальных данных о влиянии органических растворителей на свойства БК и биокаталитические процессы в целом – необходимый этап при разработке стратегии выбора растворителя (*a solvent engineering strategy*).

В работе [91] приведены значения $\log P$ для 107 соединений. На основе анализа известных из

литературы и собственных результатов, в том числе полученных авторами для реакции ферментативной переэтерификации трибутирина и гептанола, сформулированы два основных экспериментальных правила выбора оптимального органического растворителя:

1) биокатализ протекает наиболее эффективно в неполярных растворителях, имеющих значение $\log P > 4$, менее эффективно – при $4 > \log P > 2$, неэффективно – в полярных растворителях с $\log P < 2$;

2) полярность микроокружения (интерфазы) липазы $\log P_i$ внутри БК и органической фазы $\log P$ снаружи “настраивают” с учетом полярности субстрата $\log P_s$ и продукта $\log P_p$ следующим образом: величины разности параметров $|\log P_i - \log P_s|$ и $|\log P - \log P_p|$ должны быть минимальны, в то время как $|\log P_i - \log P_p|$ и $|\log P - \log P_s|$ – максимальны (случай, когда субстрат является ингибитором, не рассматривается).

При выборе состава реакционной среды для реакции этерификации, осуществляемой иммобилизованной липазой *gPichia/lip*, автор (Г.А. Коваленко) со своими сотрудниками руководствовались описанными выше критериями. Были исследованы шесть индивидуальных растворителей, а также восемь смесей различного состава. Это бинарные смеси гексана с диэтиловым эфиром в объемном соотношении 1 : (0.5–3), а также смесей из гексана с соразтворителями (ацетоном, диэтиловым эфиром, толуолом, *трет*-бутанолом) в объемном соотношении (4–5) : 1. В качестве объекта исследований выбрана реакция этерификации гептановой кислоты с участием биокатализатора ЛипоКарб. Найдено, что для изученной реакции оптимальным индивидуальным растворителем являлся гексан: активностью БК была максимальной, $400 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$ (табл. 8, рис. 3а) [85, 86]. При увеличении полярности растворителей ($\log P < 2$) скорость реакции резко уменьшалась, тогда как в неполярных растворителях ($\log P > 3$) иммобилизованная липаза проявляла на порядок более высокую активность (табл. 8). Сравнительно невысокая этерифицирующая способность ЛипоКарб в неполярном гексадекане (табл. 8) была связана с высокой динамической вязкостью этого растворителя и с сопутствующими ей диффузионными ограничениями массопереноса субстратов к иммобилизованной липазе. При использовании бинарных смесей гексана и диэтилового эфира в реакциях этерификации гептановой (C_7) кислоты спиртами C_2 , C_4 , C_8 , C_{16} наблюдалось практически линейное повышение активности БК при переходе от полярного ДЭЭ ($\log P = 0.85$) к неполярному гексану ($\log P = 3.5$) (рис. 3б) [85]. Обнаружено, что ДЭЭ является оптимальным соразтворителем в гексане, поскольку в данной смеси скорость реакции синтеза СЭ и

Таблица 8. Активность БК типа ЛипоКарб и конверсия кислоты в реакции синтеза бутилгептаноата в зависимости от природы индивидуального органического растворителя

Растворитель	Полярность растворителя, значение $\log P$ [91]	Активность БК (начальная), мкмоль $\text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$	Конверсия кислоты за 6 ч, %
Ацетон	-0.23	4.0	7
Диэтиловый эфир	0.85	44.0	33
Хлороформ	2.0	22.3	40
Толуол	2.5	302.6	92
Гексан	3.5	399.7	93
Гексадекан	8.8	189.5	81

операционная стабильность ЛипоКарб были максимальными [85]. Ацетон инактивировал ЛипоКарб обратимо, т.е. при возвращении БК в среду, не содержащую эти растворители, активность БК частично (на 70–80%) или полностью (на 100%) восстанавливалась. Реакция этерификация в *трет*-бутаноле, применяемом в качестве индивидуального растворителя или соразтворителя, не протекала, и ее скорость была практически равна нулю, поскольку, как показали дополнительные исследования, *трет*-бутанол являлся конкурентным ингибитором иммобилизованной липазы.

Найденные в [85] корреляционные зависимости между величиной этерифицирующей активности БК ЛипоКарб и полярностью органических растворителей и их смесей, а также величинами разностей $|\log P - \log P_s|$ и $|\log P - \log P_p|$ частично подтвердили правила, описанные в работе [89]. Так, реакция этерификации гептановой кислоты C_7 алифатическими спиртами C_2 , n - C_4 , n - C_8 , n - C_{16} протекала с более высокими скоростями

ми в неполярных растворителях и их бинарных смесях со значениями $\log P > 2$, а в бинарных смесях гексана и ДЭЭ наблюдалась практически линейная зависимость падения активности БК при уменьшении $\log P_{\text{смеси}}$ (рис. 3б). Кроме того, было обнаружено, что чем меньше величина разности $|\log P - \log P_p|$, тем выше скорость синтеза соответствующего СЭ [85]. Это также согласуется с правилом, сформулированным в работе [89]. При этом корреляций между активностью БК и минимумом $|\log P - \log P_s|$ не выявлено, отсутствовала и монотонная зависимость между активностью приготовленных БК и $\log P_s$ (рис. 4а), тогда как зависимость значения $\log P_s$ от длины углеродного скелета молекулы субстрата-спирта имела четко выраженный линейный характер (рис. 4б). Найдено, что независимо от длины углеродного скелета субстрата-кислоты S_1 и значения $\log P_s$ субстрата-спирта S_2 скорость синтеза *бутиловых* (C_4) эфиров монокарбоновых насыщенных кислот была максимальной, а *дециловых* (C_{10}) эфиров –

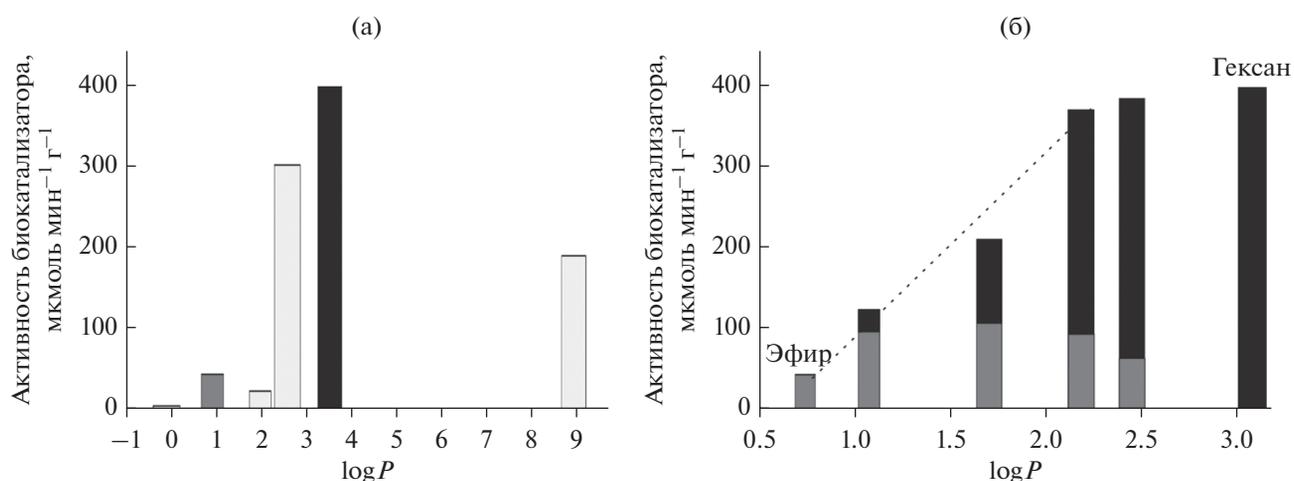


Рис. 3. Активность БК ЛипоКарб в зависимости от значения $\log P$ в среде индивидуального органического растворителя (а) и в бинарной смеси гексана и диэтилового эфира (б) в реакции синтеза бутилгептаноата [85]. Условия реакции: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 0.25 М кислота, 0.5 М спирт, интенсивное перемешивание. Продолжительность 1 реакционного цикла – 2–5 ч.

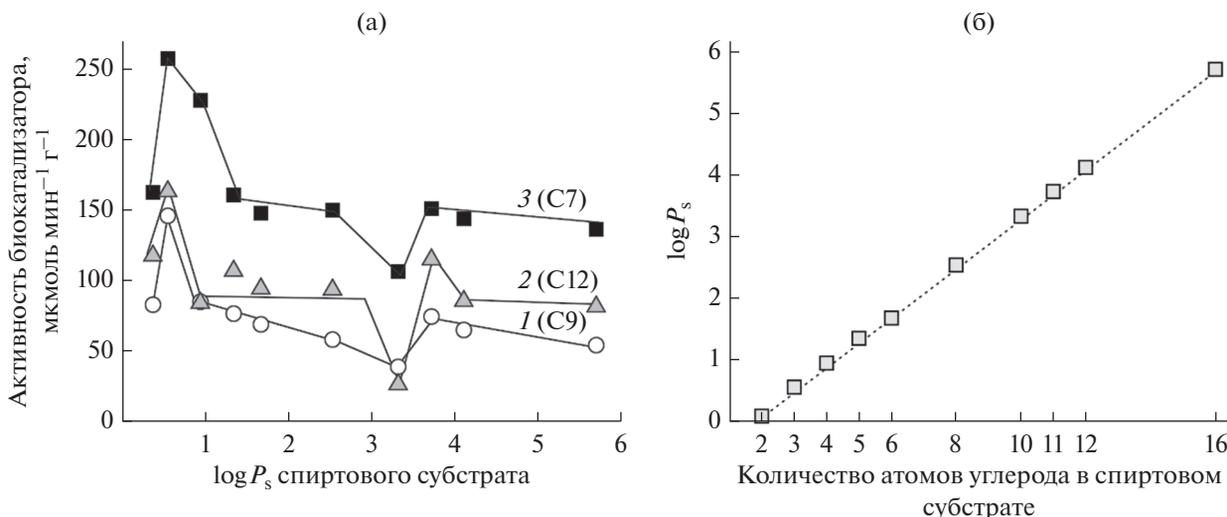


Рис. 4. а – Зависимость активности БК типа ЛипоКарб от параметра $\log P_s$ для субстрата-спирта в реакции синтеза сложных эфиров кислот: 1 – нонановой (пеларгоновой, C₉), 2 – додекановой (лауриновой, C₁₂), 3 – гептановой (энантовой, C₇); б – значение $\log P_s$ от количества атомов углерода в молекуле алифатического *n*-спирта [88].

минимальной (рис. 4а). Показано, что скорость синтеза бутилгептаноата с участием обоих типов приготовленных БК была наибольшей, поэтому при составлении матриц/диаграмм субстратной специфичности, основанных на сравнении относительных активностей БК, именно данная активность принята за единицу [79, 82, 88].

На основании систематических исследований найдены оптимальный состав реакционной среды и условия проведения реакции этерификации, в которых достигалась практически полная конверсия субстрата-кислоты в очень мягких условиях ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар) (табл. 9). Установлено, что природа субстратов, прежде всего длина углеродного скелета молекул субстратов S₁ и S₂, влияли на выбор органического растворителя и бинарных смесей. Следует также отметить, что для подготовки БК к следующему реакционному циклу использовали, как правило, смесь гексан : диэтиловый эфир (Г : ДЭЭ) в соотношении 1 : 1, поскольку под дей-

ствием такого бинарного растворителя десорбция продукта реакции (сложного эфира) с поверхности носителей-адсорбентов как углеродной, так и силикатной природы протекала наиболее полно.

2.3. Каталитические свойства БК, разработанных в ИК СО РАН

2.3.1. Этерифицирующая активность БК. Сравнение двух типов приготовленных БК, ЛипоСиб и ЛипоКарб, показало, что их каталитические свойства в значительной степени зависели от химической природы носителей-адсорбентов (табл. 10). Так, ферментативная активность и каталитическая константа липазы в составе БК Липосил были в 20–30 раз меньше, чем таковые для фермента в составе ЛипоКарб (табл. 10). Константы Михаэлиса, характеризующие образование фермент-субстратного комплекса ES₁ и обратно пропорциональные константе равновесия его образования,

Таблица 9. Оптимальный состав реакционной среды для проведения реакции этерификации с участием биокатализаторов ЛипоКарб

Субстраты и сложные эфиры (СЭ)	Оптимальный состав реакционной среды	Продолжительность одного реакционного цикла для достижения 90%-ной конверсии субстрата-кислоты
Короткоцепочечные СЭ жирных кислот C ₄ –C ₇ и первичных алифатических спиртов C ₂ –C ₈	Гексан	C ₄ –C ₆ – 10 ч, C ₇ – 2–4 ч [82]
Длинноцепочечные СЭ жирных кислот C ₉ –C ₁₈ и первичных спиртов <i>n</i> -C ₉ –C ₁₆	Г : ДЭЭ = 3 : 1	6–10 ч [88]
Моноэфиры диолов C ₄ –C ₆ и гептановой (C ₇) кислоты	Хлороформ	24 ч [87]

Таблица 10. Каталитические свойства липазы *gPichia/lip*, иммобилизованной на мезопористом силикагеле и макропористом углеродном аэрогеле, в реакции синтеза *n*-бутил гептаноата

Биокатализатор	Содержание БК в реакционной среде, мас. %	Максимальная активность БК*, мкмоль мин ⁻¹ г ⁻¹	Удельная активность иммобилизованной липазы, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка	Константа Михаэлиса* к С ₇ -кислоте, моль/л	Каталитическая константа*, с ⁻¹
ЛипоСил	21	22.3	3.3	0.22	3.7
ЛипоКарб	1	513.9	5.1	0.36	110.0

* Параметры были рассчитаны с помощью программного обеспечения Origin® путем аппроксимации экспериментальных данных гиперболической кривой, соответствующей полной кинетике Михаэлиса–Ментен.

имели один порядок по величине, однако гептановая (С₇) кислота (S₁) связывалась в 1.6 раз прочнее с липазой, иммобилизованной на силикагеле, чем на углеродном аэрогеле (табл. 10). Несмотря на сравнительно низкую эффективность катализа с участием ЛипоСил, данный БК обладает несомненными преимуществами, такими как: 1) высокая операционная стабильность (30–40 реакционных циклов без потери первоначальной активности [78, 82]), обеспечивающая коммерчески привлекательную продуктивность БК; 2) высокая механическая прочность; 3) доступность и низкая стоимость носителя-силикагеля, который используется как осушитель газов и производится в промышленном масштабе.

При сравнении двух методов синтеза сложных эфиров – органического и биокатализа – очевидными становятся как достоинства, так и недостатки биокаталитического (ферментативного) синтеза СЭ. К основным достоинствам биокатализа можно отнести следующее:

1) мягкие условия реакции этерификации (температура не выше 50°C, давление 1 бар);

2) высокая конверсия субстрата-кислоты (до 80–95%) при 100%-ной селективности ферментативной реакции синтеза СЭ;

3) не требуется специального оборудования для удаления из реакционной среды воды как нежелательного продукта реакции, сдвигающего равновесие реакции в сторону гидролиза образующегося эфира.

Следует отметить, что очистка полученного СЭ производится традиционными методами органической химии, а именно либо вакуумной дистилляцией, либо вымораживанием, как, например, при случае цетиллаурата (спермацета). Главным недостатком предложенного метода ферментативного синтеза сложных эфиров является сравнительно низкая концентрация субстратов-реагентов в реакционной среде (не выше 1–2 моль/л), что делает процедуру выделения целевого продукта в очищенном виде более трудозатратной и продолжительной во времени.

2.3.2. Субстратная специфичность. Субстратная специфичность рекомбинантной липазы *gPichia/lip*, иммобилизованной на силикагеле и углеродном аэрогеле, и ее зависимость от химической природы носителя-адсорбента исследованы наиболее подробно. Были составлены матрицы и/или диаграммы специфичности, основанные на сравнении измеряемых величин скоростей реакции этерификации более 60 пар субстратов S₁ + S₂; при этом за единицу, как отмечалось выше, принята максимальная скорость реакции синтеза бутилгептаноата. Матрица специфичности, полученная с использованием короткоцепочечных (С₂–С₉) субстратов, приведена в работах [78, 82] (табл. 11). Диаграммы относительной активности ЛипоСил и ЛипоКарб в реакции синтеза высокомолекулярных СЭ для длинноцепочечных субстратов-кислот С₉, С₁₀, С₁₈ (S₁) и субстратов-спиртов С₂–С₁₆ (S₂) описаны в работе [88].

Систематические масштабные исследования субстратной специфичности адсорбированной рекомбинантной липазы *gPichia/lip* в составе БК ЛипоСил и ЛипоКарб позволили обнаружить как общие свойства БК, так и различия между ними, обусловленные химической природой носителей-адсорбентов. Общее заключалось в наличии широкой субстратной специфичности в реакции синтеза широкого набора сложных эфиров насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот С₄–С₁₈ и первичных алифатических *n*-спиртов С₂–С₁₆ в очень мягких условиях (20 ± 2°C, 1 бар). Сравнительный анализ также показал, что оба типа приготовленных БК характеризовало следующее:

1) максимальная скорость реакции наблюдалась при синтезе бутилгептаноата – сложного эфира гептановой (С₇) кислоты и бутилового (С₄) спирта (*n*-, *изо*-), поэтому, как уже отмечалось, при составлении матриц и/или диаграмм специфичности данная скорость и соответствующая ей активность БК принималась за единицу;

2) минимальной была скорость синтеза этиловых (С₂) эфиров жирных кислот по сравнению со скоростью этерификации с участием спиртов, в которых количество атомов углерода превышало С₃;

Таблица 11. Матрица субстратной специфичности биокатализаторов ЛипоСил и ЛипоКарб в реакции синтеза душистых сложных эфиров короткоцепочечных субстратов S_1 и S_2

БК	Кислота	<i>n</i> -Спирт				
		C_2	C_3	C_4	C_5	C_8
ЛипоСил	Бутановая (масляная) C_4	0.08	0.21	0.21	0.19	0.15
ЛипоКарб		0.19	0.41	0.25	0.43	0.18
ЛипоСил	Пentanовая (валериановая) C_5	0.09	0.23	0.28	0.15	0.17
ЛипоКарб		0.23	0.29	0.25	0.25	0.19
ЛипоСил	Гексановая (капроновая) C_6	0.08	0.26	0.31	0.23	0.19
ЛипоКарб		0.22	0.20	0.27	0.19	0.21
ЛипоСил	Гептановая (этантовая) C_7	0.54	0.98	1.00*	0.88	0.85
ЛипоКарб		0.89	0.84	1.00*	0.88	0.85
ЛипоСил	Нонановая (пеларгоновая) C_9	0.27	0.64	0.54	0.52	0.56
ЛипоКарб		0.31	0.46	0.29	0.28	0.24

* За единицу принята максимальная активность БК, измеренная в одинаковых условиях при проведении реакции синтеза бутил гептаноата.

3) скорость синтеза сложных эфиров C_{10} деканола была наименьшей и не зависела ни от химического строения молекулы субстрата-кислоты (S_1), ни от природы носителя-адсорбента (силикагель или углеродный аэрогель);

4) изомеры кислот *изо*- C_4 - C_5 этерифицировались со скоростями на 1–2 порядка ниже по сравнению с линейными молекулами (*n*- C_4 - C_5), в то же время изомерия спиртов C_4 - C_5 практически не влияла на скорость этерификации;

5) влияние на скорость этерификации строения молекулы субстрата-кислоты S_1 , а именно длины углеродного скелета кислоты, было суще-

ственнее по сравнению с длиной молекулы субстрата-спирта S_2 (рис. 5);

б) скорость реакции этерификации с участием вторичных спиртов была на порядок ниже по сравнению с первичными; третичные спирты в реакции этерификации не участвовали.

Анализ субстратной специфичности БК ЛипоСил и ЛипоКарб показал, что для них наблюдались следующие различия. Во-первых, в реакции синтеза этиловых (C_2) эфиров различных насыщенных монокарбоновых кислот C_4 - C_{18} , т.е. независимо от строения молекулы субстрата S_1 , относительная активность ЛипоСил была существенно ниже, чем у липазы в составе БК ЛипоКарб: напри-

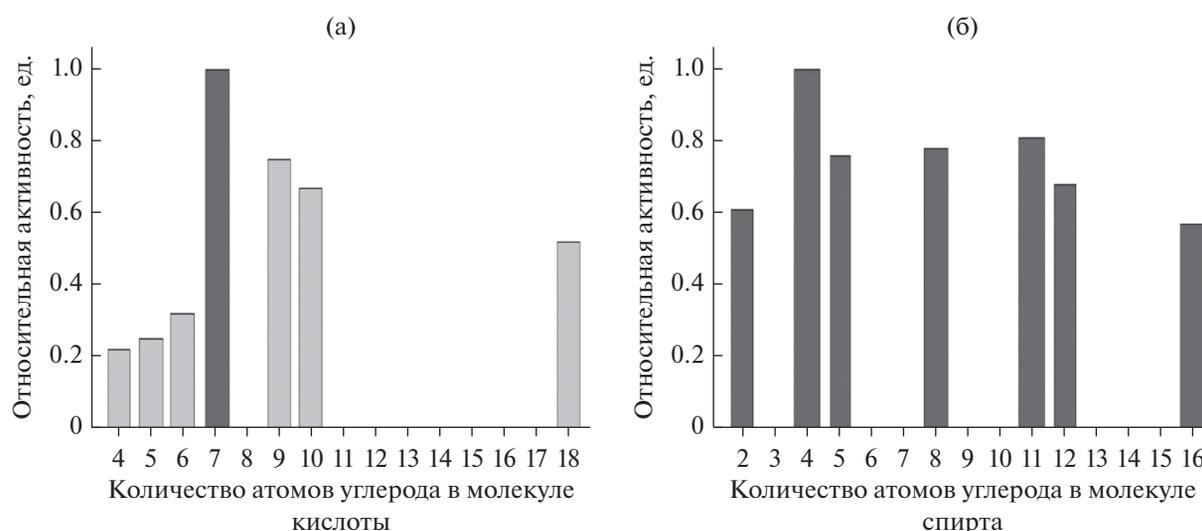


Рис. 5. Диаграмма специфичности ЛипоСил в реакции этерификации кислот C_4 - C_{18} бутиловым (C_4) спиртом (а), гептановой (C_7) кислоты спиртами C_2 - C_{16} (б).

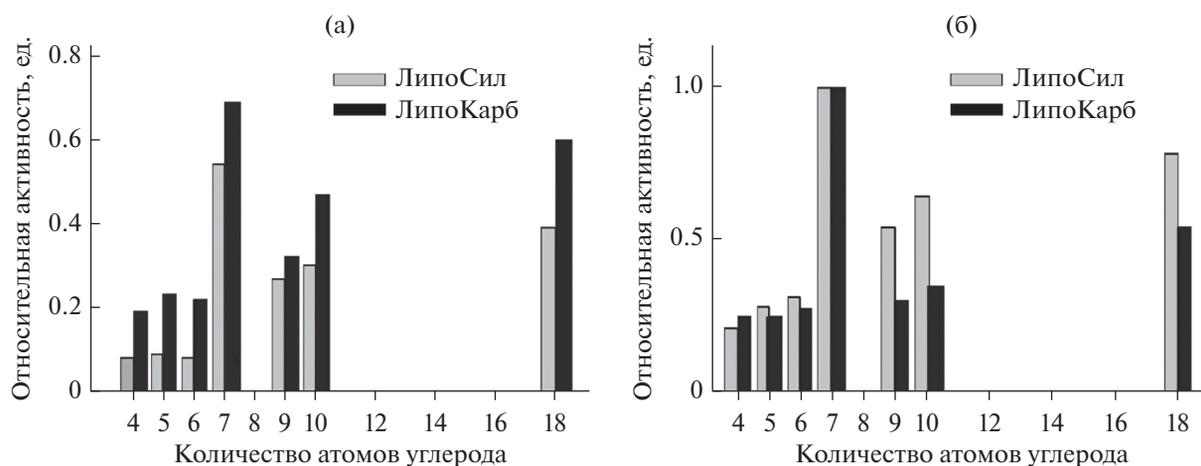


Рис. 6. Диаграмма специфичности биокатализаторов ЛипоСил (серые колонки) и ЛипоКарб (черные колонки) в реакциях этерификации жирных кислот C_4 – C_{18} этанолом (а) и *n*-бутанолом (б) [88].

мер, для кислот C_4 – C_6 – меньше в 2.4–2.8 раза, для кислот C_7 – C_{18} – меньше в 1.2–1.6 раза (рис. 6а). По-видимому, углеродный аэрогель, активно адсорбируя этиловый (C_2) спирт на поверхности углеродной нанотрубки (УНТ), проявлял защитный эффект от инактивирующего (токсичного) действия этанола на жизненно важные ферменты, в том числе, липазу; при этом в реакции образования бутиловых (C_4) эфиров данный эффект не наблюдался (рис. 6б). Во-вторых, при синтезе высокомолекулярных СЭ высших кислот C_7 – C_{18} (например, C_9 , C_{10} , C_{18}) и спиртов C_4 – C_{11} , наоборот, относительная активность ЛипоСил была в 1.5–2 раза выше по сравнению с ЛипоКарб (рис. 6б), что оказалось весьма неожиданным результатом. Поскольку общеизвестно, что гидрофобные высокомолекулярные субстраты S_1 и S_2 обладают большим сродством к гидрофобной поверхности УНТ (по сравнению с SiO_2), то можно было ожидать, что их приповерхностная концентрация повышалась за счет гидрофобных взаимодействий с поверхностью носителя-адсорбента; в таком случае скорость реакции этерификации могла увеличиться. С другой стороны, за счет этих же взаимодействий массоперенос субстратов, возможно, путем латеральной диффузии непосредственно к активному центру липазы, был затруднен, или определенные трудности могли возникать при распаде фермент-субстратного комплекса $ES_1S_2 \rightarrow E + P$ и/или при десорбции продукта реакции – сложного эфира, более высокомолекулярного и более гидрофобного соединения по сравнению с S_1 и S_2 . В результате изменение скорости этерификации как многостадийного процесса в целом довольно непредсказуемо, и, как показали исследования, гидрофильный ЛипоСил оказался более эффективным БК для синтеза гидрофобных высокомолекулярных СЭ по сравнению с гидрофобным

ЛипоКарб, несмотря на его сравнительно слабые каталитические свойства (табл. 10). Следует еще раз подчеркнуть несомненное преимущество ЛипоСил по сравнению с ЛипоКарб, которое заключается в том, что носителем-адсорбентом для приготовления БК этого типа является коммерческий мезопористый силикагель КСК-Г®, доступный и дешевый продукт многотоннажного химического производства.

Моноэфиры жирных кислот и многоатомных спиртов – алифатических полиолов – как известно, обладают чистящими, моющими, а также эмульгирующими, диспергирующими и стабилизирующими свойствами. Эти моноэфиры применяются и в производстве пластмасс в качестве мономеров и пластификаторов. Кроме того, данные соединения используются как компоненты синтетических смазочных масел. Добавление к нефтяной основе технически обоснованного количества эфира с целью получения так называемого сложноэфирного масла приводит к существенному улучшению его эксплуатационных параметров, таких как повышение смазочных и вязкостно-температурных характеристик, снижение температуры застывания. Высокое качество сложноэфирных смазочных композиций служит основой для разработки базовых авиационных и редукторных, а также универсальных и всесезонных (в том числе арктических) моторных масел. В настоящее время опубликовано не много научных работ, включая российские исследования, по ферментативному синтезу сложных эфиров многоатомных спиртов, в том числе диолов. В работе [62] изучали реакцию синтеза эфиров лауриновой (C_{12}) кислоты и симметричного 1,4-бутиленгликоля с участием ПЛ (табл. 7). В оптимальных условиях конверсия лауриновой кислоты составила 78% при 30°C за 24 ч. Было проведено три реакцион-

ных цикла (кратность равна 2), в ходе которых конверсия кислоты уменьшилась с 78 до 27%, т.е. скорость реакции этерификации в третьем реакционном цикле упала почти в 3 раза. В работе [69] исследована реакция синтеза эфиров насыщенных жирных кислот (каприновой C_{10} , лауриновой C_{12} и пальмитиновой C_{16}) и ПЭГ-400, протекающая в смеси бензола с гексаном при участии ПЛ (табл. 7). В оптимальных условиях образовывался сложный эфир, при этом конверсия для кислот C_{10} , C_{12} и C_{16} составила 80, 78 и 44% соответственно при 25°C за 48 ч.

Авторы [87] изучали в качестве субстратов S_2 диолы, различающиеся длиной углеродного скелета (от 2 до 6 атомов С), положением ОН-группы и изомерией углеродного скелета, такие как как 1,2-этандиол (этиленгликоль) и его олигомеры (ди- и три-), 1,2-пропандиол (пропиленгликоль), 1,3-пропандиол, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол, а также 2-этил-1,3-гександиол. Для проведения реакции этерификации использовали органические растворители (гексан, хлороформ, ацетон), выбор которых определялся, прежде всего, растворимостью субстратов и продуктов ферментативной реакции. Были выполнены сравнительные исследования влияния структуры диолов на свойства приготовленных БК ЛипоКарб, таких как ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность, измеренная в периодическом процессе низкотемпературного синтеза эфиров гептановой (C_7) кислоты и диолов в хлороформе при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар. Как видно из табл. 12 скорость синтеза эфиров гептановой кислоты с короткоцепочечными диолами C_2 , C_3 , содержащими как первичные, так и вторичные ОН-группы, была чрезвычайно низкой (близкой к нулю), и конверсия кислоты $\geq 50\%$ наблюдалась только через 7 сут. При использовании 1,4-бутандиола в качестве субстрата реакция протекала в течение первых 2 ч; затем реакция останавливалась при конверсии кислоты $\sim 25\%$, и дальнейшего изменения этого показателя не наблюдалось в течение последующих 24 ч. Хотя начальная активность, рассчитанная из начального линейного участка кинетической кривой в первые 2 ч, была равна 80.5 мкмоль/мин на 1 г БК (табл. 12), после первого реакционного цикла БК практически полностью инактивировался: во 2-ом цикле его активность составила 0.5% от первоначального значения, измеренного в 1-ом цикле [87]. Установлено, что диолы C_2 – C_4 являются необратимыми ингибиторами адсорбированной липазы *gPichia/lip*. Поскольку, как известно, этиленгликоль и бутандиол принадлежат к веществам 3-го класса опасности, то, вероятно, они способны инактивировать жизненно важные ферменты, в том числе липазу. Диолы, такие как 1,6-гександиол и разветвленный 2-этил-гексан-1,3-диол, этерифицировались

со сравнительно высокими скоростями: так, активность БК составила более 70 мкмоль мин $^{-1}$ г $^{-1}$ (табл. 12). Как показал газохроматографический анализ, в изученных условиях при достаточно высокой конверсии гептановой кислоты, равной 70–90%, доля моноэфиров диолов достигала $98 \pm 1\%$ [87]. Как видно из табл.12, максимальные значения активности (84 мкмоль мин $^{-1}$ г $^{-1}$) и конверсии кислоты (94% за 24 ч) наблюдались в реакции этерификации гептановой кислоты 1,6-гександиолом. В изученных условиях доля моноэфира составила $99 \pm 1\%$.

Установлено, что важную роль при синтезе сложных моноэфиров исследованных диолов играло максимальное расстояние между первичными ОН-группами в их молекуле. Действительно, наблюдалась корреляция между этим расстоянием и активностью приготовленных БК (рис. 7): чем оно больше, тем выше этерифицирующая активность приготовленных БК. Для этиленгликоля и его ди- и три-олигомеров обнаружена практически линейная зависимость (рис. 7, кривая 1). Анализируя найденные корреляции, можно предложить следующий путь синтеза моноэфиров диолов с участием БК ЛипоКарб. Известно, что активный центр этого фермента находится на глубине 0.6–0.8 нм от поверхности его белковой молекулы. Первый субстрат, гептановая кислота (S_1) входит в активный центр и образует промежуточный фермент-субстратный комплекс ES_1 , затем формируется комплекс со вторым субстратом-диолом ES_1S_2 , который затем распадается, образуя продукты, в том числе ценный моноэфир. Если максимальная длина диола больше глубины “залегания” активного центра, то формируется продуктивный фермент-субстратный комплекс ES_1S_2 . Если диол является короткоцепочечным, то его вторая ОН-группа может взаимодействовать с остатками аминокислот боковых стенок активного центра фермента. Таким образом, короткоцепочечные диолы C_2 – C_4 либо искажают конформацию молекулы и ее активного центра, либо блокируют выход продуктов, что приводит к невозможности эффективного биокатализа.

2.3.3. Операционная стабильность. Приготовленные БК обладали высокой операционной стабильностью и в изученных условиях сохраняли первоначальную этерифицирующую активность в течение нескольких десятков реакционных циклов (рис. 8) [78, 82]. Основная причина этого заключалась в аккумуляции воды как продукта реакции этерификации внутри БК, что в средах органических растворителей создавало благоприятное водное микроокружение вблизи иммобилизованной липазы. Поскольку этерифицирующая активность ЛипоСил и ЛипоКарб практически не изменялась в течение 30–40 реакционных циклов (500–1000 ч работы), то была оценена

Таблица 12. Начальная активность БК ЛипоКарб в реакции этерификации гептановой (C_7) кислоты и различных диолов в хлороформе

Диол	Начальная активность БК, $\mu\text{моль мин}^{-1}/\Gamma_{\text{БК}}^{-1}$	Конверсия кислоты, % (за x ч)	Доля моноэфира, %
Симметричные, первичные ОН-группы			
1,2-Этандиол	<1	2 (24 ч)	100.0
1,3-Пропандиол	<1	15 (24 ч)	96.5
1,4-Бутандиол	80.5	25* (2 ч)	95*
1,6-Гександиол	83.7	94.4 (24 ч)	98.6
Несимметричные, первичная и вторичная ОН-группы			
1,2-Пропандиол	<1	25 (24 ч)	98.6
2-Этил-гексан-1,3 диол	67.6	67.8 (6 ч)	97.9
Этиленгликоли, первичные ОН-группы			
Этиленгликоль	<1	2 (24 ч)	100.0
Диэтиленгликоль	25.7	53.6 (7 ч)	98.3
Триэтиленгликоль	58.0	84.1 (7 ч)	96.5

* Реакция останавливается через 2 ч при конверсии 25%, и основным продукт – это непрореагировавший 1,4-бутандиол, потому точность такой оценки не высокая.

продуктивность БК в тоннах полученного продукта на 1 кг БК. В изученных условиях в зависимости от молекулярного веса СЭ продуктивность БК составила ~2–6 т синтезированного СЭ на 1 кг БК.

Были проведены исследования стабильности приготовленных БК типа ЛипоКарб в периодическом процессе синтеза моноэфиров различных диолов [87]. Как отмечалось выше, короткоцепочечные диолы C_2 – C_4 необратимо инактивировали/ингибировали БК типа ЛипоКарб, что приво-

дило к практически полной потере их активности в течение 1–3 реакционных циклов. Под действием хлороформа БК также становились полностью неактивными в течение 1–3 реакционных циклов, поэтому было проведено исследование возможности их реактивации путем замены реакционной среды, а именно хлороформа на гексан. Так, после каждого реакционного цикла синтеза моноэфира диола, проведенного в хлороформе, следующий цикл синтеза бутилгептаноата осуществляли в гексане. Обнаружено, что при замене реакционной среды активность БК частично или полностью восстанавливалась и даже увеличивалась (в 1.1–1.3 раза) по сравнению с первоначальной (рис. 9б). При использовании 1,6-гександиола в качестве субстрата S_2 БК реактивировался, затем его активность медленно падала от цикла к циклу (рис. 9а, черные колонки). При применении в качестве субстрата S_2 триэтиленгликоля приготовленные БК отличались сравнительно высокой операционной стабильностью как в реакции синтеза его моноэфиров, так и образования бутилгептаноата (рис. 9б). Если субстратом S_2 был разветвленный диол, 2-этил-1,3-гександиол, БК инактивировался медленнее, чем в случае линейного диола: так, за 20 реакционных циклов БК сохранил ~40 и ~80% первоначальной активности при синтезе эфиров 1,6-гександиола и 2-этил-1,3-гександиола соответственно (рис. 9а и 9в). Таким образом, используя один и тот же БК ЛипоКарб, можно получать ценные продукты органического синтеза, в том числе моноэфиры диолов и бутиловые эфиры гептановой кислоты, в течение продолжительного времени, применяя на практике

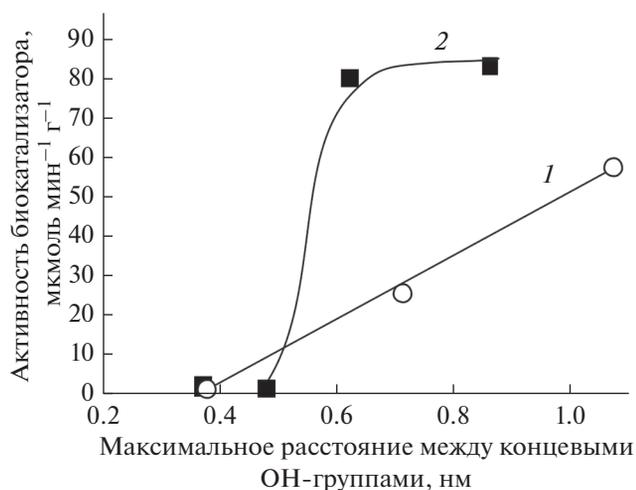


Рис. 7. Этерифицирующая начальная активность биокатализаторов в зависимости от максимального расстояния между концевыми ОН-группами в молекуле этиленгликоля и его олигомеров (1, \circ) и симметричных диолов (2, \blacksquare).

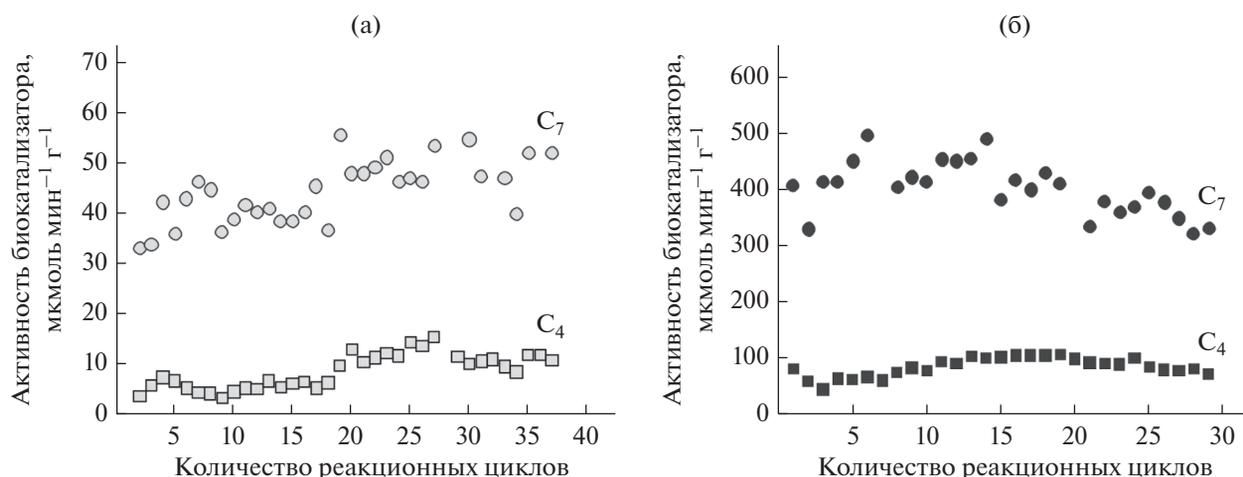


Рис. 8. Стабильность биокатализаторов ЛипоСил (а) и ЛипоКарб (б) в реакции этерификации масляной (C₄) и гептановой (C₇) кислот *n*-бутиловым (C₄) спиртом.

прием смены состава реакционной среды и субстратов, участвующих в реакции.

В последние десятилетия, как отмечалось выше, интенсивно развивается направление “ферментная инженерия”, изучающее изменение (модуляцию) функциональных свойств ферментов (modulation of functional properties) при иммобилизации на различных по химической природе носителях и вполне созвучное первоначальному названию “инженерная энзимология”, данному в 1980-х гг. [1, 2]. Как уже отмечалось выше, по мнению авторов обзора [12] “ферментная инженерия” полностью совместима с другими химическими и/или биологическими подходами, используемыми для улучшения функциональных свойств ферментов, и успех такой “инженерной” работы определяется доступностью широкого набора протоколов (способов) иммобилизации. Несомненно, это направление является интересным и перспективным для успешного развития гетерогенного биокатализа.

Возможность управления (модуляции) функциональными свойствами ферментов, включая липазы, с помощью ферментной инженерии, а именно путем выбора носителя для иммобилизации, можно продемонстрировать примерами. Так, каталитические свойства липазы В из *Candida antarctica* в реакции гидролитического разделения *R*- и *S*-изомеров (\pm)-2-О-бутирил-2-фенилуксусной кислоты модулировали иммобилизацией на носителях, обладающих гидрофобными свойствами, таких как бутил-(C₄)-агароза, октил-(C₈)-агароза и октадецил-(C₁₈)-Serabeads [92]. С ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов (C₄ → C₁₈) скорость реакции увеличивалась приблизительно в 2 раза, при этом изменялась и стереоспецифичность биокатализа. В работе [93] авторы исследовали свойства липазы из *Penicillium* sp.,

иммобилизованной на описанных выше носителях. Для данного фермента также обнаружено, что с ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов начальная скорость гидролиза *n*-нитрофенил-(C₁₆)-пальмитата в буферном растворе и масла сардины в двухфазной системе с циклогексаном многократно возрастала (в 4.1 и 2.3 раза соответственно). Авторы предположили, что носители, различающиеся по гидрофобности, оказывают влияние на конформацию активного центра фермента, и, как результат, обуславливают гиперактивацию липазы и все наблюдаемые различия в функциональных свойствах фермента при его иммобилизации. В работе [94] было показано, что скорость этанолиза масла и региоселективность реакции в полностью безводной среде зависели от природы носителей, используемых для иммобилизации липазы из *T. lanuginosus*. Так, при иммобилизации фермента на носителях C₁₈-Serabeads и C₁₈-Purolite были получены неселективные БК, тогда как в случае носителей, модифицированных дивинилбензольными группами, выявлена 1,3-селективность по отношению к триглицеридам [94].

Как показали описанные выше исследования, функциональные свойства иммобилизованных ферментов, такие как каталитическая активность, субстратная специфичность и стабильность, определяются физико-химическими свойствами поверхности носителей-адсорбентов, применяемых для иммобилизации. Экспериментальные результаты, обобщенные в работе [88], подтвердили литературные данные о том, что для приготовления активных и стабильных БК на основе иммобилизованной липазы *Pichia*/lip, следует использовать носитель-адсорбент с выраженной гидрофобностью поверхности. Начавшиеся исследования по гидрофобизации мезопористого силикагеля продемонстрировали, что активность БК в этом

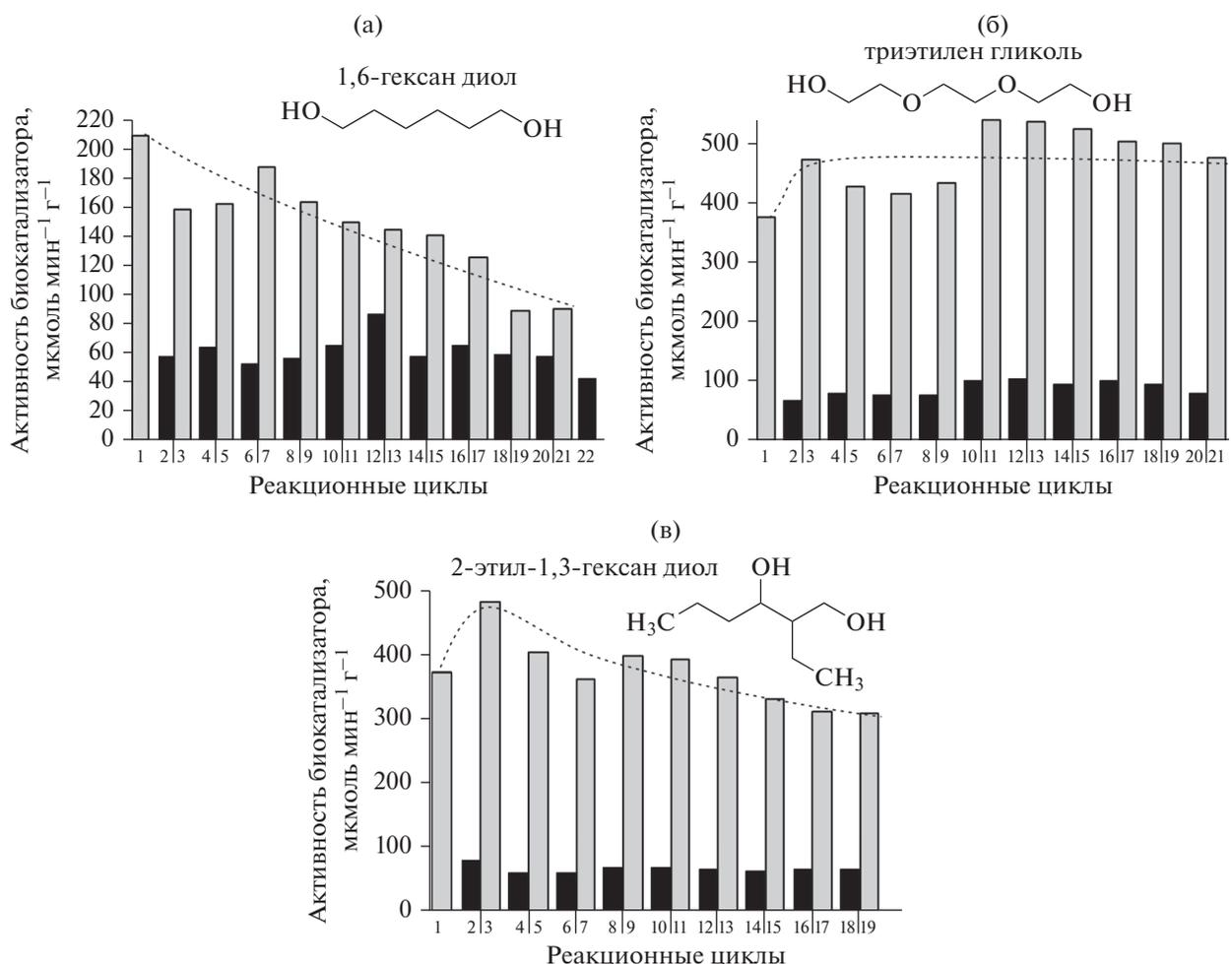


Рис. 9. Активность биокатализаторов в реакции этерификации гептановой (C_7) кислоты 1,6-гександиолом (а), триэтиленгликолем (б) и 2-этил-1,3-гексан диолом (в). Условия реакции: $20 \pm 2^\circ C$, 0.1 г биокатализатора, 3.0 мл среды. Состав среды в четных реакционных циклах (черные колонки): 0.25 М кислота, 0.75 М диол, хлороформ. Состав среды в нечетных реакционных циклах (серые колонки): 0.25 М кислота, 0.5 М бутанол, гексан.

случае увеличилась на три порядка по сравнению с таковой для БК, приготовленного путем адсорбции на исходном немодифицированном SiO_2 (не опубликовано).

Современное направление в биокатализе – компьютерное моделирование (КМ) 3D-структуры молекул ферментов, в том числе TLL (*Thermomyces lanuginosus* lipase), включая расчет и предсказание влияния мутаций, вносимых в первичную структуру, на функциональные свойства ферментов, прежде всего, на термостабильность [95]. Последующее проведение генно-инженерного конструирования штаммов-продуцентов и получение рекомбинантных ферментов с заданными функциональными свойствами является логичным продолжением этих работ. Современные методы КМ, согласующиеся с экспериментальными результатами, позволяют решать такие фундаментальные задачи, как выяснение механизма иммобилиза-

ции фермента на твердых носителях, глубокий анализ возможных конформационных перестроек в молекуле фермента при его иммобилизации, а также изучение структурно-функциональных особенностей комплекса фермент–носитель.

С целью выяснения механизма взаимодействия липазы из *T. lanuginosus* с УНТ авторами было проведено компьютерное моделирование [88]. Следует пояснить, что изученная липаза *rPichia/lip* является рекомбинантным ферментом, аналогичным липазе TLL [36], а гранулы углеродного аэрогеля образованы хаотично переплетенными углеродными нанотрубками [84]. Для компьютерного моделирования были выбраны следующие объекты: мономер и димер TLL, одностенные УНТ диаметром 6.785 и 7.834 Å и длиной 50 и 100 Å. Были получены следующие результаты:

1) гидрофобные взаимодействия между липазой и УНТ были преобладающими и осуществля-

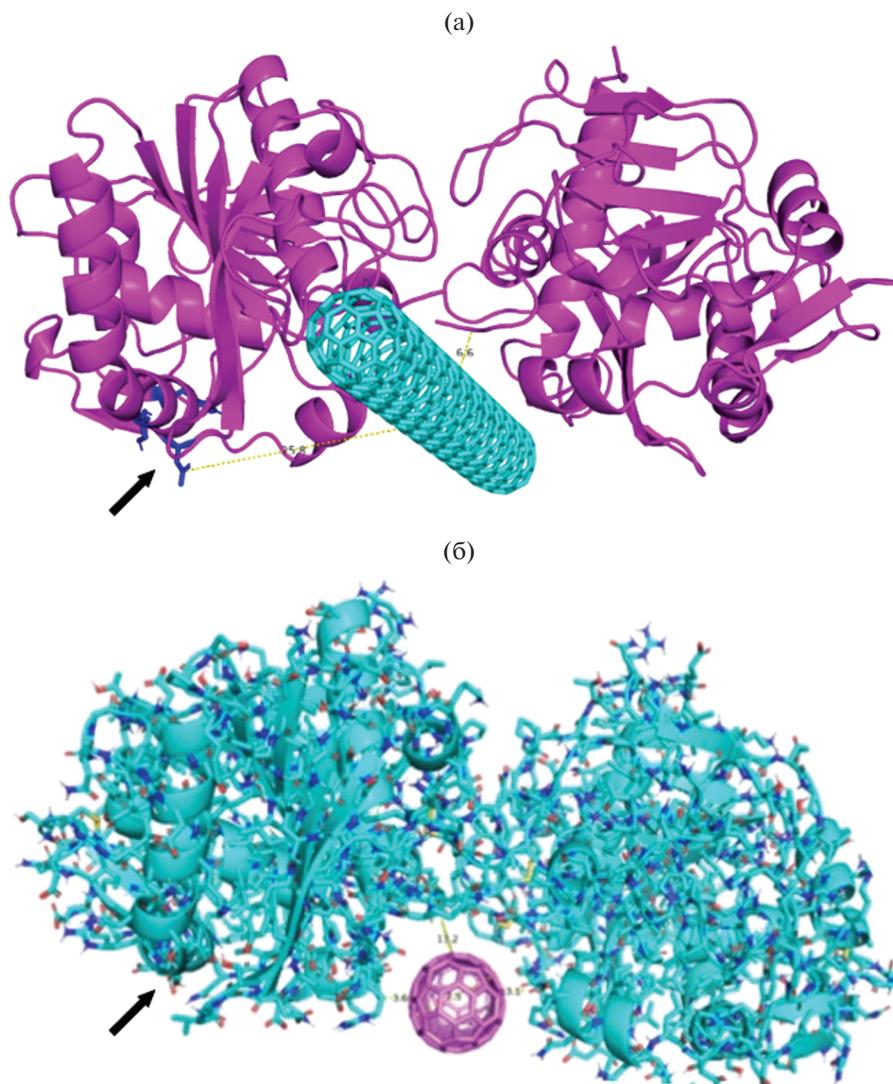


Рис. 10. а, б – Докинг димера TLL с одностенной УНТ длиной 50 Å, диаметром 7.834 Å ($n = 10, m = 0$) [88]. Стрелка указывает на активный центр фермента. Показаны расстояния между активным центром липазы (Asp96-His110-Ser115) и УНТ. Приведены разные представления изображения димера TLL и ракурсы взаимодействия фермента с УНТ.

лись с помощью остатков аминокислот TLL – лизина, аргинина, аспарагина, пролина; присутствовали также π -катионные взаимодействия с остатком лизина;

2) энергия взаимодействия между димером липазы и нанотрубкой не зависела от длины УНТ и составила –28 ккал/моль;

3) энергия взаимодействия мономера TLL с углеродной нанотрубкой была в 2 раза меньше, чем димера, поскольку число связей уменьшается пропорционально;

4) учет *in silico* подвижности боковых остатков аминокислот приводил к снижению энергии на 3 ккал/моль (в расчете на мономер);

5) УНТ связывалась в щели между двумя мономерами липазы (рис. 10б);

6) активные центры димера TLL, состоящего из мономеров А и Б, находились на расстоянии на 0.66 и 2.58 нм от УНТ (рис. 10а). В этом случае можно предположить, что для низкомолекулярных субстратов C_4 – C_7 доступны оба активных центра иммобилизованной липазы, тогда как для высокомолекулярных субстратов с количеством атомов углерода C_{10} и выше доступен преимущественно один активный центр на расстоянии 2.6 нм от УНТ.

Таким образом, в результате проведенных исследований [36, 75–88] было установлено, что функциональные свойства иммобилизованной рекомбинантной липазы *rPichia/lip*, такие как ак-

тивность и субстратная специфичность, изменялись (модулировались) в зависимости от химической природы носителя. Приготовленные БК существенно различались по каталитическим свойствам: так, активность и каталитическая константа для БК ЛипоСил были в 20–30 раз ниже, чем для ЛипоКарб. Несмотря на широкую субстратную специфичность обоих типов БК, синтез этиловых эфиров насыщенных монокарбоновых кислот протекал более эффективно с участием гидрофобного ЛипоКарба, тогда как синтез высокомолекулярных эфиров с выраженной гидрофобностью – с участием гидрофильного типа ЛипоСила. Для обоих типов приготовленных БК максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой (C_7) кислоты бутиловым (C_4) спиртом, а минимальная – бутановой (C_4) кислоты дециловым (C_{10}) спиртом. Полученные активные и стабильные БК, несомненно, обладают высоким практическим потенциалом для реализации “зеленых” процессов низкотемпературного синтеза разнообразных сложных эфиров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре приведены сведения об исследованиях отечественных научных групп/лабораторий, активно и вполне продуктивно работающих в области гетерогенного биокатализа на протяжении последних десятилетий. Описаны разработанные ими гетерогенные БК, защищенные патентами РФ, и альтернативные химическим биокаталитические процессы ферментативной конверсии исходных реагентов (субстратов) в ценные, востребованные на рынке химические продукты. Наиболее подробно рассмотрены БК, активным компонентом которых являются иммобилизованные рекомбинантные липазы. Данные БК разработаны для переэтерификации триглицеридов растительных масел и масложировых смесей, а также для процессов низкотемпературного синтеза разнообразных по составу сложных эфиров путем этерификации органических кислот спиртами. Приведены способы приготовления БК и характеристики их каталитических свойств, таких как ферментативная активность, кинетические константы, субстратная специфичность, стабильность. На основании литературных и собственных данных с учетом активности и операционной стабильности выполнена оценка продуктивности приготовленных БК, а именно количество получаемого ценного продукта на 1 кг БК. При благоприятном стечении обстоятельств практически важные результаты, рассмотренные и проанализированные в обзоре, могут быть предложены коммерческим предприятиям/компаниям для апробации и использования в лабораторном и/или полупромышленном масштабе.

Дополнительно следует упомянуть исследования, проводимые на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Сотрудники лаборатории экобиокатализа (зав. лаб, проф., д.х.н. Е.Н. Ефременко) интенсивно работают с одноферментными реакциями, направленными на деградацию токсичных соединений (синтетических фосфорорганических пестицидов, природных микотоксинов, боевых отравляющих веществ), а не на синтез ценных продуктов органической химии, как в представленном обзоре. Полная библиография работ этого коллектива находится на сайте <https://istina.msu.ru/profile/Efremenko/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность Л.В. Перминовой и А.Б. Беклемишеву за активное участие в проведении экспериментальных исследований. Автор благодарен Ю.Г. Максимовой (yul_max@mail.ru, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь) и К.Л. Шнайдер (0202-84@mail.ru, Казанский национальный исследовательский технологический университет) за редактирование текста и дополнительные комментарии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект АААА-А21-121011390007-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Мартинек К. Введение в прикладную энзимологию. М.: Изд-во Московского университета, 1982. 383 с.
2. Березин И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии. М.: Наука, 1990. 382 с.
3. Биокатализ. Под ред. Березина И.В., Кузнецова В.И. М.: Наука, 1984. 344 с.
4. Bommarius A.S.; Reidel, B.R. Biocatalysis. WILEY-VCH, Germany, 2004. 611p.
5. Hou C.H. Handbook of Industrial Biocatalysis. Taylor & Francis Group, 2005. 900 p.
6. Grunwald P. Biocatalysis. Imperial College Press, 2009. 1035 p.
7. Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U.T. Biocatalysts and Enzyme Technology. WILEY-VCH, 2005. 431 p.
8. DiCosimo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G. // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 6437. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>

9. *Tao J., Kazlauskas R.* Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development. WILEY, 2011. 479 p.
10. *Illanes A., Wilson L., Vera C.* Problem Solving in Enzyme Biocatalysis. WILEY, 2014. 318 p.
11. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б. Имобилизованные нерастущие микроорганизмы и их лизаты для одноферментных биокаталитических процессов / Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. Под ред. Ефременко Е.Н. М.: РИОР, 2018. С. 57. <https://doi.org/10.29039/02004-3>
12. *Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R.* // *Enz. Microb. Technol.* 2007. V. 40. P. 1451.
13. *Bolivar J.M., Woodley J.M., Fernandez-Lafuente R.* // *Chem. Soc. Rev.* 2022. V. 51. P. 6251.
14. Астаурова О.Б., Леонова Т.Е., Полякова К.Н., Синюкая И.В., Гордеев В.К., Яненко А.С. // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 1. С. 21.
15. Коваленко Г.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А., Скрыпник О.В., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. // Кинетика и катализ. 2009. Т. 50. С. 937. (Kovalenko G.A., Chuenko T.V., Rudina N.A., Skrypnik O.V., Maksimova Yu.G., Maksimov A.Yu. // *Kinet. Catal.* 2009. V. 50. P. 899.)
16. Максимова Ю.Г., Демаков В.А., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Коваленко Г.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 416.
17. Максимова Ю.Г., Рогожникова Т.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 484.
18. Демаков В.А., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Рогожникова Т.А. Патент РФ 2500814, 2013.
19. Максимова Ю.Г., Мавлютова Т.А., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Демаков В.А. // Вестн. Пермского университета. Сер. биология. 2013. Вып. 2. С. 49.
20. Горбунова А.Н., Максимова Ю.Г., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 482.
21. Максимов А.Ю., Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Олонцев В.Ф. Патент РФ 2352635, 2009.
22. Максимова Ю.Г., Никулин С.М., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Патент РФ 2634414, 2017.
23. *Salaheldeen M., Mariod A.A., Aroua M.K., Rahman S.M.A., Soudagar M.E.M., Fattah I.M.R.* // *Catalysts.* 2021. V. 11. P. 1121. <https://doi.org/10.3390/catal11091121>
24. *Jin Z., Han S.-Y., Zhang L., Zheng S.-P., Wang Y., Lin Y.* // *Biores. Technol.* 2013. V. 130. P. 102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.020>
25. *Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V., Valdez B.* // In: *Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies.* Rijeka: InTech Europe, 2011. P. 397.
26. *Bajaj A., Lohan P., Jha P.N., Mehrotra R.* // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2010. V. 62. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.018>
27. *Cortez D.V., Reis C., Perez V.H., De Castro H.F.* / In: *Sustainable Biotechnology-Enzymatic Resources of Renewable Energy.* Springer, 2018. P. 247. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6>
28. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Яковлева Е.Ю., Пыхтина М.Б. // Катализ в промышленности. 2014. № 6. С. 71. (Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Yakovleva E.Yu., Pykhtina M.B. // *Catal. Indust.* 2015. V. 7. № 1. P. 73.)
29. *Luna C., Gascón-Pérez V., López-Tenllado F.J., Bautista F.M., Verdugo-Escamilla C., Aguado-Deblas L., Calero J., Romero A.A., Luna D., Estévez R.* // *Catalysts.* 2021. V. 11. P. 1350. <https://doi.org/10.3390/catal11111350>
30. *Gómez-Calvo A., Gallardo E., Ladero M.* // *Catalysts.* 2022. V. 12. P. 1673. <https://doi.org/10.3390/catal12121673>
31. Копицын Д.С., Альмяшева Н.Р., Жигалова Л.В., Новиков А.А. // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. 2014. Т. 21. № 4. С. 3.
32. *Almyasheva N.R., Shukhtueva M.I., Petrova D.A., Kopitsyn D.S., Kotelev M.S., Vinokurov V.A., Novikov A.A.* // *Mycoscience.* 2018. V. 59. № 2 P. 147. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.09.003>
33. Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Сорокина К.Н., Розанов А.С., Пельтек С.Е., Новиков А.А., Альмяшева Н.Р., Пармон В.Н. // Катализ в промышленности. 2015. № 6. С. 90. <https://doi.org/10.19412/180160-0387-2015-6-90-96>
34. Новиков А.А., Котелев М.С., Семенов А.П., Гуцин П.А., Иванов Е.В., Сорокина К.Н., Розанов А.С., Винокуров А.С. Патент РФ 2528778, 2014.
35. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Sapunova L.I.* A peculiar method for immobilization of non-growing microbial cells by entrapment into silica xerogel / In: *Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology. Ser. Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine.* Eds. Varfolomeev S.D., Zaikov G.E., Krylova L.P. New York: NOVA Science Publishers, Inc., 2010. P. 41.
36. Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Перминова Л.В., Коваленко Г.А. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 5. С. 5. (Beklemishev A.B., Pykhtina M.B., Perminova L.V., Kovalenko G.A. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. P. 887.)
37. Коваленко Г.А., Беклемишев А.Б., Перминова Л.В., Мамаев А.Л., Чуенко Т.В., Кузнецов В.Л. Патент РФ 2539101, 2015.
38. Сидоренко А.И., Склярченко А.В., Яроцкий С.В. // Цитология. 2018. Т. 60. № 7. С. 567. <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.07.16>
39. Борголов А.В., Василос Р.Г., Горин К.В., Готовцев П.М., Дьяков А.В., Сергеева Я.Э. Патент РФ 2646104, 2018.
40. Войткевич С.А. 865 душистых веществ для парфюмерии и бытовой химии. М.: Пищевая промышленность, 1994. 594 с.
41. Солдатенков А.Т., Колядина Н.М., Ле Туань Ань. Основы органической химии душистых веществ для прикладной эстетики и ароматерапии. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. 240 с.
42. Смирнов Е.В. Пищевые ароматизаторы (справочник). Санкт-Петербург: Профессия, 2008. 736 с.
43. *Ferrer M., Soliveri J., Plou F.J., Lopez-Cortes N., Reyes-Duarte D., Morten C.M., Copa-Patino J.L., Ballesteros A.* // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. V. 36. P. 391.

44. *Chang S.W., Shaw J.F.* // *New Biotechnol.* 2009. V. 26. № 3–4. P. 109.
45. *Giorgi V., Botto E., Fontana C., Mea L.D., Vaz S. Jr., Menéndez P., Rodríguez P.* // *Catalysts.* 2022. V. 12. P. 610. <https://doi.org/10.3390/catal12060610>
46. *de Almeida R.M., Souza F.T.C., Junior M.A.C., Albuquerque N.J.A., Meneghetti S.M.P., Meneghetti M.R.* // *Catal. Commun.* 2014. V. 46. P. 179.
47. *Stergiou P.Y., Foukis A., Filippou M., Koukouritaki M., Parapoulis M., Theodorou L.G., Hatziloukas E., Afendra A., Pandey A., Papamichael E.M.* // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 1846.
48. *Gumel A.M., Annuar M.S.M., Heidelberg T., Chisti Y.* // *Proc. Biochem.* 2011. V. 46. P. 2079.
49. *Sun J., Lee L.W.W., Liu S.Q.* // *Aust. J. Chem.* 2014. V. 67. P. 1373.
50. *Villeneuve P.* // *Biotechnol. Adv.* 2007. V. 25. P. 515.
51. *Pereira A.S., de Souza A.H., Fraga J.L., Villeneuve P., Torres A.G., Amaral P.F.F.* // *Catalysts.* 2022. V. 12. P. 88. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>
52. *Zaks A., Klibanov A.M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 3192.
53. *Wong C.-H.* // *Science.* 1989. V. 244. P. 1145.
54. *Halling P.J.* // *Enzyme Microbiol. Technol.* 1994. V. 16. P. 178.
55. *Janssen A.E.M., Sjursnes B.J., Vakurov A.V., Halling P.J.* // *Enz. Microb. Technol.* 1999. V. 24. P. 463.
56. *Marty A., Chulalaksananukul W., Willemot R.M., Condore J.S.* // *Biotecnol. Bioeng.* 1992. V. 39. P. 273.
57. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е.* Ферменты. Лабораторный практикум. 2011. Санкт-Петербург: Изд. “Перспект науки”. 256 с.
58. *Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С., Калачёва Н.В.* // *Биотехнология.* 1998. № 4. С. 81.
59. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Елизарова Е.В.* // *Вестник КГТУ.* 2004. № 1. С. 239.
60. *Елизарова Е.В., Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С.* // *Вестник КГТУ.* 2006. № 6. С. 69.
61. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Елизарова Е.В., Васина К.Л.* // *Вестник КГТУ.* 2007. № 2. С. 103.
62. *Зиновьева М.Е., Гамаюрова В.С., Шнайдер К.Л., Назаренко Е.В.* // *Вестник технологического университета.* 2015. Т. 18. № 1. С. 100.
63. *Шнайдер К.Л., Сабирзянова Г.Р., Низамутдинова М.Х., Зиновьева М.Е., Каюмова А.Ф.* // *Вестник технологического университета.* 2017. Т. 20. № 12. С. 129.
64. *Шнайдер К.Л., Каюмова А.Ф., Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е.* // *Вестник технологического университета.* 2017. Т. 20. № 11. С. 156.
65. *Гамаюрова В.С., Бильданова Н.И., Джамай М.* // *Вестник технологического университета.* 2017. Т. 20. № 10. С. 136.
66. *Гамаюрова В.С., Давлетшина Г.А.* // *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология.* 2020. Т. 10. № 3 (34). С. 515.
67. *Гамаюрова В.С., Воробьев Е.С., Шнайдер К.Л., Ржещицкая Л.Э.* // *Вестник ПГТУ. Химическая технология и биотехнология.* 2021. № 1. С. 24.
68. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Елизарова Е.В.* // *Катализ в промышленности.* 2008. № 3. С. 54.
69. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Калачева Н.В., Шнайдер К.Л.* // *Катализ в промышленности.* 2015. № 2. С. 73. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-2-73-78>
70. *Гамаюрова В.С., Шнайдер К.Л., Джамай М.Д.Д.* // *Катализ в промышленности.* 2016. № 3. С. 64.
71. *Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е., Шнайдер К.Л., Давлетшина Г.А.* // *Катализ в промышленности.* 2020. Т. 20. № 3. С. 216.
72. *Gamaurova V.S., Shnaider K.L., Zaripova S.K., Jamaï M.J.* // *J. Thermodyn. Catal.* 2016. V. 7. № 1. P. 161. <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000161>
73. *Гамаюрова В.С., Воробьев Е.С., Давлетшина Г.А., Ржещицкая Л.Э.* // *Кинетика и катализ.* 2021. Т. 62. № 3. С. 316.
74. Заявка 2022103443/04 (007329), с пр. от 11.02.2022.
75. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Ткаченко В.И.* // *Биотехнология.* 2013. № 6. С. 35. doi: 10.1134/S0003683814070047 (*Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Tkachenko V.I.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. V. 50. № 7. P. 709.)
76. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Рудина Н.А.* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. № 6. С. 570. (*Kovalenko G.A., Perminova L.V., Chuenko T.V., Rudina N.A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. P. 582.) <https://doi.org/10.1134/S0003683816060089>
77. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Чуенко Т.В.* Патент РФ 2668405, 2018.
78. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Патрушев Ю.В.* // *Катализ в промышленности.* 2017. Т. 17. № 5. С. 399. DOI: 10.18412/1816-0387-2017-5-399-406 (*Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Mamaev A.L., Patrushev Yu.V.* // *Catal. Indust.* 2018. V. 10. № 1. P. 68.)
79. *Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Чуанов Н.В., Патрушев Ю.В.* // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2017. № 11. С. 2194. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-2002-6> (*Perminova L.V., Kovalenko G.A., Chukanov N.V., Patrushev Yu.V.* // *Russ. Chem. Bul., Int. Ed.* 2017. V. 66. № 11. P. 2194.)
80. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б.* // *Вестник ПГТУ. Химическая технология и биотехнология.* 2018. № 2. С. 7. <https://doi.org/10.15593/2224-9400/2018.2.01>
81. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B.* // *React. Kinet. Mech. Catal.* 2019. V. 128. № 1. P. 479. <https://doi.org/10.1007/s11144-019-01648-z>
82. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhina M.B., Beklemishev A.B.* // *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 2021. V. 36. 102124. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102124>
83. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Кузнецов В.Л., Мосеенков С.И.* Патент РФ № 2725474, 2020.
84. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Krasnikov D.V., Kuznetsov V.L.* // *J. Porous Mater.* 2018. V. 25. P. 1017. <https://doi.org/10.1007/s10934-017-0512-0>
85. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В.* // *Катализ в промышленности.* 2020. Т. 20. № 4. С. 313. (*Kovalenko G.A., Per-*

- minova L.V.* // Catal. Indust. 2021. V. 13. № 1. P. 90.)
<https://doi.org/10.1134/S2070050421010074>
86. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B.* // Catal. Today. 2021. V. 379. P. 36.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018>
87. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Шашков М.В., Беклемишев А.Б.* // Кинетика и катализ. 2022. Т. 63. № 2. С. 212. (*Kovalenko G.A., Perminova L.V., Shashkov M.V., Beklemishev A.B.* // Kinet. Catal. 2022. V. 63. P. 188.
<https://doi.org/10.1134/S0023158422020045>
<https://doi.org/10.31857/S0453881122020046>
88. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Холявка М.Г., Бучельникова В.А., Артюхов В.Г.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 5. С. 446. (*Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Pykhtina M.B., Holyavka M.G., Buchelnikova V.A., Artyukhov V.G.* Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 5. P. 540.
<https://doi.org/10.1134/S000368382205009X>
<https://doi.org/10.31857/S0555109922050099>
89. *Abildskov J., van Leeuwen M.B., Boeriu C.G., van den Broek L.A.M.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2013. V. 85–86. P. 200.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.012>
90. *Wu S., Wu Y., Sun B., Zhang P., Tang K.* // React. Kinet. Mech. Catal. 2022.
<https://doi.org/10.1007/s11144-022-02339-y>
91. *Laane C., Boeren S., Vos R., Veeger C.* // Biotechnol. Bioeng. 1987. V. 30. P. 81.
92. *Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M.* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 57. P. 171.
93. *Turati D.F.M., Morais W.G. Jr., Terrasan C.R.F., Moreno-Perez S., Pessela B.C., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Carmona E.C.* // Molecules. 2017. V. 22. P. 339.
94. *Silveira E.A., Moreno-Perez S., Basso A., Serban S., Mamede R.P., Tardioli P.W., Farinas C.S., Rocha-Martin J., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M.* // BMC Biotechnol. 2017. V. 17. P. 88.
95. *Bohr S.S., Lund P.M., Kallenbach F.S., Pinholt Y., Thomsen J., Iversen L.* // Sci. Rep. 2019. V. 9: P. 16169.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52539-1>

Biocatalysts and Processes of Enzymatic Conversion of Substrates Into Valuable Products of Chemical Organic Synthesis (Review of Domestic Developments)

G. A. Kovalenko*

Boreskov Institute of Catalysis, Siberian Branch of Russian Academy of Science Av. Akad. Lavrentyeva, 5, Novosibirsk, 630090 Russia

**e-mail: galina@catalysis.ru*

Biocatalysis, both in homogeneous and heterogeneous modes, is an independent interdisciplinary direction of scientific and practical research of predominantly one-stage processes of conversion of initial reagents (substrates) into valuable products that are in demand on the market, with the participation, as a rule, of one enzyme as a catalyst. Biocatalytic *single-enzyme* processes, which have all the specific features of enzymatic catalysis, are alternative and quite competitive compared to traditional chemical production. This review provides information on the investigations and success of Russian research groups/laboratories that have been actively and productively working in the field of the biocatalysis over the past decades and have practical developments protected by Russian patents, which, under favorable circumstances, can be offered to commercial enterprises/companies for testing and use on a laboratory and/or semi-industrial scale with the prospect of industrial scale-up. In the review, special attention is paid to targeted systematic studies of lipolytic enzymes (lipases), which have a unique ability to catalyze reactions in organic solvents, including esterification and transesterification, which result in the production of valuable products of organic synthesis such as various esters. Lipases are active components of heterogeneous biocatalysts (BCs) prepared by attachment (immobilization) of these enzymes on the surface of solid supports and adsorbents. The review briefly describes the results of study by domestic research teams, provides a complete bibliography of their works, which contains information about the methods for preparing BCs, their catalytic properties (enzymatic activity, substrate specificity, operational stability), as well as the conditions for carrying out biocatalytic processes involving developed BCs such as the synthesis of acrylamide and various esters. Taking into account the average activity (A), close to the activity measured at the half-inactivation time ($t_{1/2}$), and operational stability, characterized by the value $t_{1/2}$, a rather rough assessment of the productivity of the BCs was carried out based on the amount of produced valuable product (in tons) per 1 kg of developed biocatalyst.

Keywords: biocatalysis, heterogeneous biocatalysts, single-enzyme substrate conversion, amidases, hydrolysis, acrylamide, lipases, esterification, esters