

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.16

## БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ ПРОЦЕССОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА И ПОЛУЧЕНИЯ БИОДИЗЕЛЯ

© А. И. Сидоренко,\* А. В. Складенко, С. В. Яроцкий

Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545;

\* электронный адрес: nougatanna@yandex.ru

Липаза фракции В, выделенная из дрожжей *Candida antarctica* (CALB), востребована в промышленной биотехнологии благодаря широкой субстратной специфичности в отношении синтеза-гидролиза многочисленных эфиров, амидов и тиолов, термической стабильности, проявляемой при этом высокой стерео- и региоселективности, а также способности работать на границе раздела фаз и в среде органических растворителей. Настоящая работа направлена на создание высокоактивного и стабильного технологического биокатализатора (БК) на основе CALB. Разработаны три метода иммобилизации CALB — получение поперечно-сшитых ферментных агрегатов, иммобилизация CALB на многослойных углеродных нанотрубках и метод адсорбционно-ковалентной иммобилизации на гидрофобных носителях. На основании сопоставления активности получаемых БК, эффективности иммобилизации фермента, а также их термической стабильности в органических растворителях сделан выбор в пользу адсорбционно-ковалентной иммобилизации CALB. Разработанный БК обладает синтетазной активностью 22 000—26 000 МЕ/г, что превосходит известные мировые аналоги в 2—2.5 раза. Продемонстрированы необратимость связывания CALB с носителем (в условиях инкубации в растворе детергента), а также его высокая термостабильность в органических растворителях, например в толуоле, при 95 °С (80—96 % сохранения активности после 4 ч инкубации).

Ключевые слова: биокатализаторы, иммобилизация, липаза В из *Candida antarctica* (CALB)

Принятые сокращения: БГ — боргидрид натрия, ГА — глутаровый альдегид, КЖ — концентрат культуральной жидкости, CALB — липаза фракции В из *Candida antarctica*, БК — биокатализатор, ЛК — лауриловая кислота, ПЛ — пропиловый эфир лауриловой кислоты, ПЛЕ — Международная единица активности фермента по синтезу пропиллаурата, ПС — н-пропиловый спирт, CLEAs — поперечно-сшитые ферментные агрегаты, IECALB — адсорбционно-ковалентно иммобилизованная CALB, MWCNTs — многослойные углеродные нанотрубки.

Современной тенденцией в области тонкого органического синтеза является замена методов химического синтеза на биокаталитические процессы трансформации органических соединений, протекающие в мягких условиях и при значительном снижении экологической нагрузки. При этом используют биокатализаторы на основе различных ферментов, как правило модифицированных методами генетической инженерии.

CALB и биокатализаторы на ее основе находят применение в тонком органическом синтезе, пищевой, косметической и бумажной промышленности, при производстве детергентов, а также для осуществления процессов трансэтерификации при получении биодизеля из растительного сырья (Складенко и др., 2015; Pourzolfahar et al., 2016). Высокая стереоселективность фермента (Escorcía et al., 2014) позволяет использовать его для направленных трансформаций органических соединений, в частности полупродуктов синтеза таких лекарственных препаратов, как лотрафибан, позаконазол, дарунавир и кеторолак (Складенко и др., 2015).

Целью настоящей работы являлось получение гетерогенного технологического биокатализатора на основе рекомбинантной CALB, обладающего высокой активностью и стабильностью.

### Материал и методика

Использовали следующие материалы и реактивы: концентрат культуральной жидкости (КЖ) рекомбинантного штамма *Pichia pastoris* ВКПМ Y-4298 (Vland Biotech Inc., Китай); многослойные углеродные нанотрубки (MWCNTs); Институт биохимических технологий и нанотехнологий РУДН, Москва); макропористые носители ECR1090F, ECR1030M и ECR8806F (Purolite®Life Sciences, Голландия); глутаровый альдегид (ГА, 25%-ный водный раствор), боргидрид натрия (БГ) и пропиллаурат (Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (Biosolv Chimie Sarl, Франция); лауриловая кислота (ЛК; Acros Organics, Россия); муравьиная кислота, н-пропило-

вый спирт (ПС) и сульфат аммония (Химреактив, Россия).

В качестве исходного материала для иммобилизации CALB различными методами использовали непосредственно КЖ рекомбинантного штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-4298, полученный методом ультрафильтрации (синтетазная активность 200—300 ПЛЕ/мл, содержание белка 4—5 мг/мл).

Получение поперечно-сшитых ферментных агрегатов (CLEAs-CALB). Иммобилизацию осуществляли путем осаждения CALB в виде ферментных агрегатов и последующей поперечной сшивки этих физических агрегатов ГА. Основания Шиффа, образованные при взаимодействии ГА с первичными аминогруппами белка, восстанавливали с помощью БГ. Процедуры осуществляли при 2—4 °С при перемешивании. Агрегаты осаждали сульфатом аммония (0.55 г/мл КЖ), сшивали (стадия сшивки), используя 1.0 % ГА (рН 7.0; 30 мин), и центрифугировали; на стадии восстановления оснований Шиффа использовали 1 мг/мл БГ (рН 8.0; 10 мин) и центрифугировали.

Получение CALB, иммобилизованной на многослойных углеродных нанотрубках (MWCNTs-CALB). Иммобилизацию проводили таким же способом, как в случае получения ферментных агрегатов CLEAs, осуществляя стадию осаждения в присутствии MWCNTs, взятых в количестве 2 мг/мл КЖ.

Адсорбционно-ковалентная иммобилизация CALB (получение IECALB). Иммобилизацию CALB проводили путем физической адсорбции фермента на гидрофобном носителе с последующей ковалентной сшивкой адсорбированного белка ГА и восстановлением образовавшихся оснований Шиффа БГ. Процедуры осуществляли при 20 °С и умеренном перемешивании реакционной смеси на качалке.

Стадия гидрофобной адсорбции на макропористых носителях: нагрузка на носитель 20—510 мг белка на 1 г (сухой вес; рН 7.0; 23 ч); стадия сшивки белка: 1.0—2.5 % ГА; 60—340 мин; стадия восстановления оснований

Шиффа: 0.6—4.0 мг/мл БГ; рН 8.0; 30 мин; вакуумная фильтрация.

Высушивание образцов иммобилизованной CALB. Влажные БК 2—3 раза промывали ацетоном, используя для каждой промывки растворитель в количестве 2 мл на 1 г влажного БК. Растворитель удаляли вакуумной фильтрацией. Обезвоженный БК сушили под вакуумом 30—45 мин до остаточного содержания влаги 3—7 %.

Определение синтетазной активности CALB. Синтетазную активность CALB определяли по реакции синтеза пропилового эфира лауриловой кислоты (ПЛ) при этерификации ЛК с помощью ПС при  $60 \pm 1$  °С в течение 15—60 мин. Процесс осуществляли при перемешивании реакционной смеси, содержащей 40 ммоль (3.0 мл) ПС, растворенных в 40 ммоль (8.01 г) расплавленной ЛК в присутствии 17.8 ммоль (0.32 мл) воды, и аликвоту анализируемого образца CALB. Концентрацию ПЛ и ЛК в полученной реакционной смеси определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом режиме на колонке Kromasil C8 (25 × 4 мм) при 55 °С. Подвижная фаза — ацетонитрил : вода, 95 : 5 (v/v), муравьиная кислота 0.1 объемных % (1 мл/мин); детекция при 205 нм.

За 1 ед. синтетазной (1 ПЛЕ) активности CALB принимали такое количество образца, которое катализирует образование 1 мкмоль ПЛ за 1 мин.

Изучение модельной стабильности. Стабильность CALB в модельных условиях характеризовали по относительной остаточной активности БК после инкубации образцов в органических растворителях при заданной температуре в течение 4 или 5.5 ч.

## Результаты и обсуждение

При выборе методов иммобилизации CALB основывались на таких особенностях структуры этого фермента, как высокая степень гидрофобности его поверхности

Сопоставление различных форм биокатализаторов на основе CALB

| Показатель   | Биокатализаторы (БК) |   |             |                   |                   |      |
|--|----------------------|---|-------------|-------------------|-------------------|------|
|  | КЖ CALB              | CLEAs-CALB  | MWCNTs-CALB | IECALB (ECR8806F) | IECALB (ECR1090F) |      |
| Синтетазная активность, ПЛЕ/г сухого веса (для КЖ: ПЛЕ/мл) | 250                  | 37 990  | 48 000      | 26 000            | 22 400            |      |
| Выход активности при иммобилизации, % <sup>a</sup>         | —                    | 160   | 250         | 320               | 210               |      |
| Способ отделения БК  | —                    | Центрифугирование   |             | Фильтрация        |                   |      |
| Условия инкубации  | Растворитель         | Относительная остаточная активность после инкубации, % <sup>b</sup> |             |                   |                   |      |
| 60 °С, 12 мин  | водный буфер, рН 8.0 | 50.0  | —           | —                 | —                 | —    |
| 95 °С, 4 ч   | толуол               | —   | 69.2        | 70.2              | 8.4               | 96.4 |
| 60 °С, 5.5 ч   | 1,4-диоксан          | —   | —           | —                 | 82.1              | 90.2 |
|  | этилацетат           | —   | —           | —                 | 78.6              | 90.8 |
|  | н-гексан             | —   | —           | —                 | 83.9              | 90.0 |

Примечание. <sup>a</sup> Отношение суммарной активности полученного БК к суммарной активности КЖ, взятой для иммобилизации, %; <sup>b</sup> отношение синтетазной активности БК после инкубации к исходной активности образца, %.

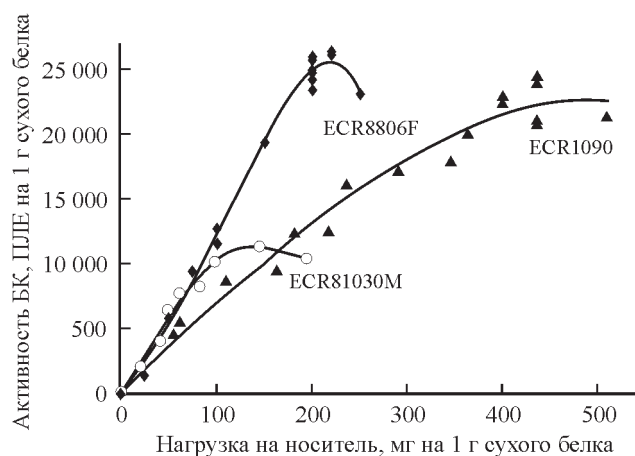
(Ferrario et al., 2013), локализация гидрофобных и гидрофильных остатков в виде больших отдельных поверхностных зон (Basso et al., 2007; Hanefeld et al., 2009), а также расположение большей части доступных остатков лизина в гидрофильных зонах поверхности белковой глобулы вдали от активного центра фермента (Lee et al., 2010; Stuz et al., 2012), что позволяет вовлекать их в процессы модификации и ковалентной сшивки без существенных потерь ферментативной активности. Важнейшую роль при получении БК на основе CALB играет механизм поверхностной активации фермента при его адсорбции на гидрофобных поверхностях (Barbosa et al., 2011), обеспечивающий существенные для катализа и стабильности фермента структурные изменения белковой глобулы, которые могут быть фиксированы в результате иммобилизации.

БК, полученные методами гидрофобной агрегации и адсорбционно-ковалентной иммобилизации, сопоставлены в таблице. БК, полученные путем гидрофобной агрегации CALB (CLEAs-CALB и MWCNTs-CALB), обладают высокой активностью. При этом выход активности процесса иммобилизации, превышающий 100 % (см. таблицу), свидетельствует о переходе молекул CALB в открытую активную форму за счет взаимодействия гидрофобных участков агрегированных молекул. На треть более высокая активность MWCNTs-CALB по сравнению с CLEAs-CALB является следствием снятия внутридиффузионных ограничений в случае осаждения и фиксации фермента на сильно развитой гидрофобной поверхности, которой обладают многослойные углеродные нанотрубки. Конформационные изменения белка, происходящие при принятии им открытой формы, приводят не только к активации, но и к стабилизации CALB (Hedfors et al., 2010). Поэтому БК, полученные путем гидрофобной агрегации CALB с последующей многоточечной ковалентной сшивкой, обладают также существенно более высокой стабильностью, чем нативный фермент (см. таблицу). При эксплуатации эти БК могут быть отделены от реакционной смеси только центрифугированием, поэтому их использование целесообразно лишь при производстве дорогих продуктов.

Самым распространенным методом иммобилизации CALB является простая физическая адсорбция на готовых полимерных носителях (Khan et al., 2014; Basso et al., 2016; Sogovic et al., 2017; Turati et al., 2017). Именно таким способом получены основные коммерческие препараты иммобилизованной CALB (Poppe et al., 2013a, 2013b). Этот метод прост и обеспечивает высокий выход активности при иммобилизации, однако обратимость связывания фермента в БК часто приводит к вымыванию CALB в процессе эксплуатации (Virgen et al., 2017), что было показано для самого распространенного коммерческого препарата Novozym435 (Chen et al., 2008; Zhao, Song, 2010; Nieguth et al., 2011).

Разработанный нами метод адсорбционно-ковалентной иммобилизации CALB сочетает гидрофобную адсорбцию фермента на развитой поверхности макропористого полимерного носителя с ковалентной необратимой фиксацией открытой активной формы CALB (Патент РФ RU 2650668C1).

Стадия адсорбции была оптимизирована в отношении нагрузки по белку для каждого из трех макропористых носителей (см. рисунок). Наличие максимума на представленных зависимостях связано, вероятно, с заполнением гидрофобной поверхности носителя и адсорбцией



Зависимость синтетазной активности биокатализаторов (БК), полученных адсорбционно-гидрофобной иммобилизацией CALB, от нагрузки по белку на носитель на стадии адсорбции.

Макропористые носители: ECR8103M — на основе дивинилбензол/метакрилата, ECR8806F — на основе полиметакрилата с привитыми на поверхности октадецильными остатками, ECR1090F — на основе полистирола.

последующих порций фермента в менее выгодной конформации, сопровождающееся возникновением внутридиффузионных ограничений в БК.

Исходя из максимальной достигаемой активности для каждого носителя, были выбраны оптимальные нагрузки по белку: для ECR8806F — 200, для ECR1090F — 400, для ECR1030M — 145 мг/г (сухого веса). Наилучшие результаты были достигнуты при использовании носителя ECR8806F благодаря наличию на его развитой внутренней поверхности высокогидрофобного слоя октадецильных остатков. Использование носителя ECR1090F на основе гидрофобной полистирольной матрицы обеспечивает получение чуть менее активного БК при более высокой нагрузке по белку, что снижает выход активности. Третий носитель (ECR1030M) на основе менее гидрофобного сополимера метакрилата с дивинилбензолом не позволил получить высокоактивный БК, в частности из-за менее развитой внутренней поверхности.

Оптимизация стадий ковалентной сшивки и восстановления оснований Шиффа позволила обеспечить 100%-ное сохранение активности адсорбированного фермента. (Оптимальные условия: 1 % ГА; модификация 60 мин, 1 мг/мл БГ; восстановление 30 мин.) Продемонстрировано полное сохранение активности адсорбционно-ковалентно иммобилизованной CALB после ее инкубации в течение 3 ч в 2.5%-ном водном растворе детергента (Тритон X-100), что свидетельствует о необратимости связывания фермента.

Полученные методом адсорбционно-ковалентной иммобилизации БК легко отделяются фильтрацией и обладают активностью 22 000—26 000 ПЛЕ/г (сухого веса), превосходящей мировые аналоги в 2—2.5 раза. Их высокая термическая стабильность в органических растворителях открывает возможности для эффективного применения в процессах органического синтеза. При этом в отличие от дорогого коммерческого препарата Novozyme 435, применяемого в настоящее время в промышленных производствах, разработанный БК (IECALB) характеризуется необратимым связыванием фермента даже в среде поверхностно-активных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения № 14.627.21.0002.

### Список литературы

«Способ получения гетерогенного биокатализатора на основе липазы дрожжей *Candida antarctica* фракции В». Патент РФ RU 2650668C1.

Склярёнок А. В., Медведева Н. В., Сидоренко А. В., Йун Хуанг, Фули Ли, Яроцкий С. В. 2016. Технологические биокатализаторы на основе липазы *Candida antarctica* и их применение (обзор). Биотехнология. 33 (3) : 10—56. (Sklyarenko A. V., Medvedeva N. V., Sidorenko A. I., Yijun H., Fuli L., Yarotsky S. V. 2016. Technological biocatalysts based on lipase from *Candida antarctica* and their use. Biotechnology. 33 (3) : 10—56.)

Barbosa O., Ortiz C., Torres R., Fernandez-Lafuente R. 2011. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: enantiospecific production of atenolol acetate. J. Mol. Catal. B: Enzym. 71 : 124—132.

Basso A., Braiuca P., Cantone S., Ebert C., Paolo Linda P., Spizzo P., Caimi P., Hanefeld U., Giuliano Degrassi G., Gardossi L. 2007. *In silico* analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads(r). Adv. Synth. Catal. 349 : 877—886.

Basso A., Hesseler M., Serban S. 2016. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. Tetrahedron. 72 : 7323—7328.

Chen B., Hu J., Miller E. M., Xie W., Cai M., Gross R. A. 2008. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. Biomacromol. 9 : 463—471.

Corovic M., Mihailovic M., Banjanac K., Carevic M., Milivojevic A., Milosavic N., Bezbradica D. 2017. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite MN102 and its application in solvent-free and organic media esterification. Bioprocess Biosyst. Eng. 40 : 23—34.

Cruz J., Barbosa O., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R., Torres R., Ortiz C. 2012. Optimized preparation of CALB-CLEAS by response surface methodology: the necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. J. Mol. Catal. B: Enzym. 80 : 7—14.

Escorcía A. M., Daza M. C., Doerra M. 2014. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. J. Mol. Catal. B: Enzym. 108 : 21—31.

Ferrario V., Veny H., De Angelis E., Navarini L., Ebert C., Gardossi L. 2013. Lipases immobilization for effective synthesis of biodiesel starting from coffee waste oils. Biomolecules. 3 : 514—534.

Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. 2009. Understanding enzyme immobilization. Chem. Soc. Rev. 38 : 453—468.

Hedfors C., Hult K., Martinelle M. 2010. Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction. J. Mol. Catal. B: Enzym. 66 : 120—123.

Khan A., Sharma S. K., Kumar A., Watterson A. C., Jayant Kumar J., Parmar V. S. 2014. Novozym 435-catalyzed syntheses of polyesters and polyamides of medicinal and industrial relevance. Chemoschem. 7 : 379—390.

Lee K. W., Min K., Park K., Yoo Y. J. 2010. Development of an amphiphilic matrix for immobilization of *Candida antarctica* lipase B for biodiesel production. Biotechnol. Bioprocess Eng. 15 : 603—607.

Nieguth R., Eckstein M., Wiemann L. O., Thum O., Ansoerge-Schumacher M. B. 2011. Enabling industrial biocatalytic processes by application of silicone-coated enzyme preparations. Adv. Synth. Catal. 353 : 2522—2528.

Poppe J. K., Costa A. P. O., Brasil M. C., Rodrigues R. C., Ayub M. A. Z. 2013a. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: characterization and application in transesterification reaction. J. Mol. Catal. B: Enzym. 94 : 57—62.

Poppe J. K., Garcia-Galan C., Matte C. R., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., Ayub M. A. Z. 2013b. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. J. Mol. Catal. B: Enzyme. 94 : 51—56.

Pourzolfaghar H., Abnisa F., Wan Daud W. M. A., Aroua M. K. 2016. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. Renew. Sustain. Energy Rev. 61 : 245—257.

Turati D. F. M., Morais Junior W. G., Terrasan C. R. F., Moreno-Perez S., Pessela B. C., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Carmona E. C. 2017. Immobilization of lipase from *Penicillium sp.* section gracilentia (CBMAI 1583) on different hydrophobic supports: modulation of functional properties. Molecules. 22 : 339—353.

Virgen-Ortiz J. J., Tacias-Pascacio V. G., Hirata D. B., Torrestiana-Sanchez B., Rosales-Quintero A., Fernandez-Lafuente R. 2017. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. Enzyme Microb. Technol. 96 : 30—35.

Zhao H., Song Z. 2010. Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids. Biochem. Eng. J. 49 : 113—118.

Поступила 7 III 2018

## BIOCATALYST FOR ENVIRONMENTALLY FRIENDLY PROCESSES OF ORGANIC SYNTHESIS AND BIODIESEL PRODUCTION

A. I. Sidorenko,\* A. V. Sklyarenko, S. V. Yarotsky

Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, 117545;

\* e-mail: nougatanna@yandex.ru

Lipase fraction B, isolated from yeast *Candida antarctica* (CALB) is in demand in industrial biotechnology due to the broad substrate specificity in terms of synthesis—hydrolysis of numerous esters, amides and thiols, thermal stability, manifested at the same time high stereo and region — selectivity, as well as the ability to work at the interface phases and in organic solvents. This work aims to create highly active and stable technology biocatalyst (BC) on the basis of CALB. There were developed three methods of immobilization of the CALB, namely, the obtaining of cross-linked enzyme aggregates; immobilization of CALB on the multi-wall carbon nanotubes and the method of adsorption-covalent immobilization on hydrophobic carriers. On the basis



of comparison of the activity of the received BC, efficiency of the immobilization of the enzyme, and also their thermal stability in organic solvents, the choice was made in favor of the adsorption-covalent immobilization CALB. Developed BC has a synthetic activity of 22 000—26 000 IU/g, which exceeds the known world analogues in 2—2.5 times. We have demonstration the irreversibility of binding of CALB with the carrier (under incubation conditions in the detergent solution), as well as its high thermal stability in organic solvents, for example, in toluene at 95 °C (80—96 % of activity after 4 hours of incubation), is demonstrated.

Key words: biocatalysts, immobilization, *Candida antarctica* lipase B, CALB

---