

УДК 577.154.2+542.952+579.22

МОДУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ *Thermomyces lanuginosus* В РЕАКЦИИ ЭТЕРИФИКАЦИИ ПУТЕМ ВЫБОРА АДсорбЕНТА

© 2022 г. Г. А. Коваленко^{1, *}, Л. В. Перминова¹, А. Б. Беклемишев^{1, 2}, М. Б. Пыхтина², М. Г. Холявка^{3, 4}, В. А. Бучельникова⁴, В. Г. Артюхов³

¹Федеральный исследовательский центр “Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, 630090 Россия

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ), НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, 630117 Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

⁴Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053 Россия

*e-mail: galina@catalysis.ru

Поступила в редакцию 30.01.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Биокатализаторы с активностью липазы (БКЛ) были приготовлены путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы (*rPichia/lip*) из термофильных микроскопических грибов *Thermomyces lanuginosus*, продуцируемой генно-инженерным штаммом метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). В качестве адсорбентов использовали различные по физико-химическим свойствам носители: мезопористый гидрофильный силикагель (SiO_2) и макропористый гидрофобный аэрогель (МУА). Ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность БКЛ были исследованы в реакции этерификации жирных насыщенных кислот и алифатических спиртов с количеством атомов углерода в молекуле от 2 до 18. Были составлены матрицы относительных активностей для более 60 пар субстратов – кислоты и спирта, путем сравнения скоростей реакции этерификации в идентичных условиях, что позволило выявить различия в специфичности БКЛ в зависимости от химической природы носителя. Было обнаружено, что для обоих типов биокатализаторов, “*rPichia/lip* на SiO_2 ” (PLSi) и “*rPichia/lip* на МУА” (PLC) максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой кислоты (C_7) бутиловым спиртом (C_4). В одинаковых условиях синтеза сложных эфиров ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар, органический растворитель – смесь гексана и диэтилового эфира), в том числе, бутилгептаноата, *rPichia/lip*, адсорбированная на силикагеле, проявляла на порядок меньшую активность, чем липаза, адсорбированная на углеродном аэрогеле. Каталитические константы, равные соответственно 3.7 c^{-1} и $1.1 \times 10^2 \text{ c}^{-1}$, различались в 30 раз. Было обнаружено, что эфиры короткоцепочечных жирных кислот C_4 – C_7 и этилового спирта синтезировались в 2–3 раза быстрее с помощью гидрофобного БКЛ типа PLC, чем с участием гидрофильного БКЛ типа PLSi. В то же время, эфиры высокомолекулярных C_9 , C_{10} , C_{18} кислот и C_8 – C_{16} спиртов, обладающих выраженной гидрофобностью, синтезировались в 1.5–2 раза быстрее с участием БКЛ типа PLSi. Операционная стабильность приготовленных биокатализаторов была достаточно высокой: приготовленные БКЛ сохраняли 82–99% первоначальной активности после проведения более 30 реакционных циклов, при этом продолжительность каждого цикла до достижения конверсии кислоты выше 85% составила несколько часов (4–6 ч).

Ключевые слова: рекомбинантная липаза из *Thermomyces lanuginosus*, адсорбция липазы, силикагель, углеродный аэрогель, биокатализаторы, каталитические свойства, этерификация

DOI: 10.31857/S0555109922050099

Функциональные свойства иммобилизованных ферментов, такие как каталитическая активность, субстратная специфичность и стабильность, определяются, как показали исследования, физико-химическими свойствами носителей-адсорбентов, используемых для их иммобилизации, например,

текстурой и полярностью/гидрофобностью поверхности. В последние десятилетия интенсивно развивается направление под названием “ферментная инженерия путем выбора способа иммобилизации”, которое изучает изменение (модуляцию) функциональных свойств ферментов при

иммобилизации. По мнению авторов обзора [1] “ферментная инженерия” 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 (модуляция) функциональными свойствами ферментов с помощью ферментной инженерии является интересным и перспективным направлением в развитии гетерогенного биокатализа.

В своих ранних работах авторы, обобщив многочисленные результаты по адсорбционной иммобилизации ферментов класса оксидоредуктаз (лактат- и алкогольдегидрогеназы, глюкозооксидаза, тирозиназа) на пироуглерод-содержащих неорганических носителях, в том числе, мезопористом θ -оксиде алюминия, сделали вывод, что для приготовления активных и стабильных биокатализаторов необходимым условием являлось взаимное геометрическое и химическое соответствие физико-химических свойств фермента и поверхности адсорбента [2]. Например, геометрическое соответствие подразумевало соответствие размеров пор, преобладающих в текстуре адсорбента, размеру гидратированной молекулы фермента (в среднем 10 нм). Это значило, что мезопоры, размером выше 10–15 нм являлись оптимальными: в таких порах фермент взаимодействовал со стенками поры многократно, его конформация становилась более жесткой и, как результат, повышалась его стабильность. Химическое соответствие подразумевало, прежде всего, наличие оптимального гидрофильно-гидрофобного баланса между свойствами фермента и поверхностью адсорбента. Например, для глюкозооксидазы максимальный стабилизирующий эффект наблюдали при адсорбции данного фермента на мезопористом θ - Al_2O_3 , содержащем 7–15 мас. % пироуглерода. Поверхность такого адсорбента напоминала “шахматную доску”: черные кластеры гидрофобного пироуглерода образовывались на сильных кислотно-основных центрах оксида алюминия и блокировали их. Оставшиеся участки незауглероженного Al_2O_3 белого цвета обладали слабокислыми полярными (гидрофильными) свойствами [2]. С другой стороны, при адсорбции на данных носителях алкогольдегидрогеназы и тирозиназы, наблюдали практически полную инактивацию этих ферментов, оптимальные носители содержали 0.5–3.0 мас. % углерода [2]. Задача выбора оптимального адсорбента решалась индивидуально для каждого конкретного фермента.

Липазы (гидролазы эфиров глицерина, КФ 3.1.1.3) катализируют разнообразные реакции – как прямые (гидролиз триглицеридов), так и обратные (синтез эфиров), последние протека-

ют в неводных средах, где содержание воды не превышает 1 об. %. Биокатализаторы с активностью липазы (БКЛ) как в гомогенном (растворимом), так и в гетерогенном (иммобилизованном) состоянии находят широкое применение в различных отраслях промышленности, таких как:

1. производство “умных” стиральных порошков, удаляющих масляные и жировые пятна путем ферментативного гидролиза триглицеридов;

2. получение метиловых/этиловых эфиров жирных кислот (ЖК), входящих в состав растительных масел и отработанных кулинарных отходов, для производства биодизеля в качестве добавки к моторному топливу путем ферментативного алкоголиза (метанолиза, реже этанолиза) триглицеридов [3–5];

3. крупномасштабное производство ценных пищевых ингредиентов для получения спредов и маргаринов, заменителей масла какао и молочных жиров, не содержащих нежелательных *транс*-изомеров ЖК и обладающих заданными органолептическими и физико-химическими свойствами (температурой плавления, пластичностью, консистенцией, сливочным вкусом) путем ферментативной переэтерификации масложировых смесей при повышенных температурах (60–80°C) [6–9];

4. синтез сложных эфиров (СЭ) путем ферментативной этерификации в очень мягких условиях (20–50°C, 1 бар).

Известно, что СЭ пользуются значительным спросом на рынке ароматизаторов, смягчающих и увлажняющих компонентов (эмоллиентов), поверхностно-активных веществ и эмульгаторов в пищевой и косметической промышленности. Биокатализаторы, приготовленные на основе иммобилизованных липаз, интенсивно исследуются для проведения “зеленых” процессов в органической химии [9–12].

Возможность управлять функциональными свойствами липаз с помощью ферментной инженерии, а именно, путем выбора носителя для иммобилизации, можно продемонстрировать несколькими примерами. Так, каталитические свойства липазы В из *Candida antarctica* в реакции гидролитического разделения R- и S-изомеров (\pm)-2-О-бутирил-2-фенилуксусной кислоты изменяли (модулировали) иммобилизацией на носителях, обладающих гидрофобными свойствами, таких как бутил-(C_4)-агароза, октил-(C_8)-агароза и октадецил-(C_{18})-Sepabeads [13]. С ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов ($\text{C}_4 \rightarrow \text{C}_{18}$) скорость реакции увеличивалась приблизительно в 2 раза, при этом также изменялась стереоспецифичность биокатализа [13].

В работе [14] авторы исследовали свойства липазы из *Penicillium* sp., иммобилизованной на описанных выше носителях. Для данного фермента

также было обнаружено, что с ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов начальная скорость гидролиза *p*-нитрофенил-(С16)-пальмитата в буферном растворе и масла сардины в двухфазной системе с циклогексаном многократно увеличивались (в 4.1 и 2.3 раза соответственно) [14]. 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 [15] было показано, что скорость этанолиза масла и региоселективность реакции в полностью безводной среде зависели от природы носителей, используемых для иммобилизации липазы из *Thermomyces lanuginosus*. Так, при использовании C_{18} -Sepabeads и C_{18} -Purolite были получены неселективные биокатализаторы, тогда как при использовании носителей, модифицированных дивинил бензольными группами, наблюдалась 1,3-селективность по отношению к триглицеридам [15].

Современным направлением в биокатализе является компьютерное моделирование (КМ) 3D-структуры молекул ферментов, в том числе TLL (*Thermomyces Lanuginosus* Lipase), расчет и предсказание влияния мутаций, вносимых в первичную структуру на функциональные свойства ферментов, прежде всего, на термостабильность [16]. Последующее проведение генно-инженерного конструирования штаммов-продуцентов и получение рекомбинантных ферментов с измененными функциональными свойствами является логичным продолжением таких работ. Очевидно, что дополнение экспериментальных методик современными методами КМ позволяет решать не только практические, но и фундаментальные задачи: выявлять механизмы процесса иммобилизации фермента на твердых носителях; проводить глубокий анализ возможных конформационных перестроек в молекуле фермента при его иммобилизации, а также структурно-функциональных особенностей комплекса фермент-носитель.

Авторы данной статьи ранее провели исследование БКЛ, приготовленных путем адсорбции рекомбинантной липазы *rPichia/lip* на неорганических носителях, в том числе, на различных углеродных нанотрубках (УНТ) [17], а также изучили процессы ферментативного низкотемпературного синтеза сложных эфиров с участием приготовленных биокатализаторов, включая выбор органического растворителя для реакционной среды [18–23]. В настоящей работе авторы продолжили систематическое изучение БКЛ и реакций этерификации ЖК, проанализировали все полученные результаты, дополнив работу современными методами компьютерного моделирования для анализа струк-

турно-функциональных особенностей комплекса липаза-носитель.

Цель работы – продолжить сравнительные исследования функциональных свойств рекомбинантной липазы TLL (активности, субстратной специфичности, стабильности) в реакции синтеза высокомолекулярных СЭ, в зависимости от химической природы неорганических адсорбентов, а также проанализировать полученные результаты с целью поиска корреляционных зависимостей и закономерностей иммобилизации. Для выяснения механизма взаимодействия молекулы липазы TLL с углеродной нанотрубкой провести компьютерное моделирование с помощью жесткого и гибкого молекулярного докинга.

МЕТОДИКА

Рекомбинантная липаза из *Thermomyces lanuginosus* (обознач. *rPichia/lip*) продуцировалась штаммом метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* X-33, специально сконструированным с помощью генно-инженерных манипуляций, как описано в работе [18]. Для приготовления БКЛ использовали буферные растворы *rPichia/lip* (0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0) с концентрацией белка 2–15 мг/мл.

Концентрацию белка в растворе измеряли методом [24] с использованием красителя Coomassie G-250 (“Sigma”, США). Растворы бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США) использовали для построения градуировочного графика.

Коммерческий силикагель (SiO_2) марки КСК-Г (АО “Химический завод им. Л.Я. Карпова, Россия) имел следующие текстурные параметры: удельная поверхность ($S_{удБЭГ}$) – $160 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, объем пор (V_{Σ}) – $0.76 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Пористость составляла 58%, мезопоры диаметром 20 нм преобладали в пористой структуре силикагеля. Размер гранул SiO_2 , взятых для приготовления БКЛ, составил 0.5–2 мм. Макропористый углеродный аэрогель (МУА) был получен в результате высокотемпературного пиролиза этилена на нанесенном катализаторе Fe:Co/CaCO₃ [25, 26]. Насыпной вес составил $0.06 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Гранулы МУА представляли собой легкие шарики черного цвета, образованные в результате хаотичного переплетения УНТ [19, 25]. МУА имел следующие текстурные параметры: $S_{удБЭГ} - 100 \pm 20 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, $V_{\Sigma} - 12 \pm 3 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, пористость составила 98%. Макропоры диаметром более 1 мкм преобладали в пористой структуре МУА, объем мезопор диаметром 2–20 нм не превышал 0.2% от V_{Σ} . Гранулы МУА диаметром 3–4 мм использовали для приготовления БКЛ. Для измерения текстурных параметров носителей использовали методы азотной и ртутной порометрии на оборудовании AutoPore 9200 и ASAP 2400 V3.07 (“Micromeritics Instrument Corpora-

tion”, США). Для проведения электронно-микроскопических исследований МУА и биокатализаторов PLC типа использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JSM 6460 LV (“JEOL”, Япония) и просвечивающий электронный микроскоп высокого разрешения (ПЭМ) JSM 2100 (“JEOL”, Япония).

Все реагенты: субстраты липазы (жирные кислоты и спирты), органические растворители (гексан, диэтиловый эфир) – реактивы производства России. Исходные реагенты и продукты реакции анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent 7000B GC/MS (“Agilent”, США) [23]. Для всех анализов была использована высокополярная колонка на основе ионной жидкости N-пропил-6-метил-хинолиний-бис(трифторметил-сульфонил)имида ($10 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.2 \text{ мкм}$). Условия хроматографического анализа были следующими: сначала колонки выдерживались 3 мин при 100°C , затем температура повышалась со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 280°C ; температура испарителя – 280°C . Скорость потока газа-носителя (гелия) составляла 1 мл/мин. Условия работы масс-спектрометра: электронная ионизация – 70 эВ, температура источника ионизации – 230°C , температура переходной линии – 250°C . Спектр регистрировали в режиме сканирования в диапазоне $40\text{--}450 \text{ m/z}$.

Биокатализаторы с активностью липазы “*rPichia/lip* на силикагеле” (PLSi) и “*rPichia/lip* на углеродном аэрогеле” (PLC) получали путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы на соответствующих носителях. Для приготовления биокатализаторов типа PLSi, гранулы силикагеля предварительно высушивали при 115°C в течение 4 ч. Высушенные гранулы (1.0 г) пропитывали по влагоемкости буферным раствором липазы (рН 7.0) с концентраций белка $10 \pm 4 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, помещали в плотно закрытый бюкс и выдерживали 5 ч при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Затем пропитанные раствором липазы гранулы высушивали в течение 1–2 сут в условиях окружающей среды до суховоздушного состояния. Количество иммобилизованной липазы (в $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) рассчитывали с учетом концентрации белка и объема порпиточного раствора, равного V_Σ силикагеля ($0.8 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$).

Биокатализаторы типа PLC были приготовлены следующим образом. Гранулы МУА размером 3–4 мм заливали раствором липазы в буфере (рН 7.0) с концентраций белка $2 \pm 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, в соотношении вес носителя : об. раствора = 1 : 100 и выдерживали в течение 1 сут при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании. Затем раствор липазы декантировали, биокатализаторы многократно промывали буферным раствором (0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0), помещали на бумажный фильтр для удаления избытка воды, и высу-

шивали в течение 1–2 сут в условиях окружающей среды до суховоздушного состояния. Величину адсорбции (в $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) рассчитывали с учетом концентрации белка до адсорбции и после ее завершения.

Приготовленные БКЛ исследовали в реакции этерификации различных пар субстратов – насыщенной монокарбоновой кислоты (S_1) и первичного алифатического спирта (S_2), различающихся длиной углеродного скелета с количеством атомов углерода от 2 до 18. Этерификацию субстратов (более 60 пар $S_1 + S_2$) проводили в следующих условиях: $22 \pm 2^\circ\text{C}$; 1 бар; начальные концентрации S_1 и S_2 соответственно $0.25 \pm 0.03 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ и $0.50 \pm 0.04 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$; растворитель – смесь гексана и диэтилового эфира в соотношении 1 : 1 (об./об.). Навески биокатализаторов заливали раствором S_1 и определяли начальную концентрацию кислоты, затем в реакционную среду добавляли S_2 в двукратном молярном избытке. Содержание биокатализаторов в реакционной среде составило 20.8 мас. % для “*rPichia/lip* на SiO_2 ” и 0.8 мас. % для “*rPichia/lip* на МУА”. Начальную скорость реакции определяли по линейному участку кинетической кривой убыли слабой органической кислоты (S_1), концентрацию которой анализировали методом титриметрии с помощью этанольного раствора NaOH с известной молярностью ($0.0256 \pm 0.0006 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с применением фенолфталеина как индикатора точки эквивалентности. Скорость реакции и ферментативную активность биокатализаторов рассчитывали и выражали, соответственно, в $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и в единицах активности (EA) на 1 г сухого биокатализатора (1 EA = $\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$). Результаты титриметрического и хроматографического анализов совпадали в пределах экспериментальной ошибки, равной 10%.

Активность биокатализаторов измеряли в периодических реакционных циклах, продолжительность каждого определялась временем достижения конверсии кислоты не ниже 85%. В первом цикле биокатализаторы проходили стадию кондиционирования, при этом их активность увеличивалась в 2–4 раза. Это было обусловлено тем, что внутри биокатализатора аккумулировалась вода, образующаяся в ходе этерификации, и формировалось благоприятное водное микроокружение для адсорбированной липазы, поддерживающее структуру молекул фермента в функциональной гидратированной форме. После окончания этерификации реакционную смесь, содержащую сложный эфир, а также небольшое количество субстратов S_1 и S_2 , декантировали. Биокатализаторы многократно промывали растворителем – смесью гексана и диэтилового эфира, затем дополнительно выдерживали в этом же растворителе в течение не менее 20 ч. Следующий реакционный

цикл проводили с отмытым биокатализатором в условиях, описанных выше.

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента с доверительной вероятностью 0.95, количество измерений $n = 3-6$. Относительная ошибка не превышала 10% (минимум 6%).

Для расчета геометрии молекул субстратов липазы S_1 и S_2 использовали метод молекулярной механики (Силовое поле MM+) в пакете программ HyperChem 7 (Hypercube Inc., США).

Компьютерное моделирование взаимодействия молекулы TLL с одностенной углеродной нанотрубкой было проведено с помощью молекулярного докинга. Кристаллическая структура TLL с разрешением 2.3 Å была взята из базы данных PDB (PDB ID: 4ZGB). Для моделирования использовали форму липазы, у которой активный центр находился в закрытой конформации [27]. Структуры УНТ различного размера были получены в программе *Nanotube Modeler* и оптимизированы в *Avogadro*. Молекулярная стыковка мономера и димера липазы с нанотрубками различной длины и диаметра была проведена с помощью программного пакета *AutoDock Vina* 1.1.2, позволяющего провести гибкий докинг (flexible docking) с учетом подвижности боковых остатков аминокислот, в частности, GLU1A, LEU6A, LYS24A, LYS24B, ASN26B, PRO29A, ARG84A, ARG84B, PRO136A, ASP137A, LYS237A. Боковые остатки этих аминокислот считались “гибкими” после проведения жесткого докинга, во время которого были оценены наиболее вероятные места связывания УНТ с липазой. Размер бокса, в который была помещена липаза, составил: $x = 126$; $y = 118$; $z = 126$. Пространственный центр липазы располагался в точке с координатами: $x = 20.489$; $y = 49.005$; $z = 0.215$. Расчет был сведен к автоматическому перебору пространственных конформаций и ориентаций нанотрубок в сайте связывания с липазой, чтобы получить комплекс липаза-УНТ с минимальной свободной энергией системы. Визуализация результатов моделирования проводилась в программах *MGLTools* и *PyMol*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования биокатализаторов PLC типа методом сканирующей электронной микроскопии показали, что морфология поверхности исходного МУА и БКЛ были практически одинаковыми: отчетливо наблюдались хаотически переплетенные УНТ, аналогично описанному в работе [19]. После адсорбции липазы “ажурность” 3D-структуры углеродного аэрогеля уменьшалась; переплетение УНТ, более утолщенных по сравнению с исходным носителем, уплотнялось; образовывались гладкие пленки, вероятно, белкового происхождения. Как видно из изображений, по-

лученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ), на стыках от переплетения УНТ наблюдались аморфные отложения, очевидно, образованные адсорбированной липазой *rPichia/lip* (рис. 1). Гранулы биокатализаторов PLC после высушивания уменьшались в диаметре 1.5–2 раза по сравнению с исходными гранулами МУА, полученными в каталитической установке высокотемпературного пиролиза этилена. После проведения первых двух-трех реакционных циклов этерификации гранулы БКЛ набухали из-за образования и аккумуляции воды, образующейся в ходе реакции, внутри данных биокатализаторов.

Учитывая текстурные параметры носителей – силикагеля и углеродного аэрогеля, а также размер гидратированной молекулы липазы, были рассчитаны величины поверхности, доступной для адсорбции *rPichia/lip*, с учетом того, что поры диаметром 20 нм и выше доступны для иммобилизации. Величина доступной поверхности ($S_{\text{доступ}}$) силикагеля, равная $77 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, составила 51% от $S_{\text{удБЭТ}}$. Для макропористого углеродного аэрогеля, как видно из текстурных параметров, вся поверхность $S_{\text{удБЭТ}}$, равная $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, доступна для адсорбции липазы. Несмотря на близкие величины $S_{\text{доступ}}$, величины адсорбции липазы на изученных носителях различались на порядок. Биокатализаторы PLSi содержали от 6.2 – 14.0 мг · г⁻¹ (количество мг белка на 1 г носителя). Величина адсорбции *rPichia/lip* на МУА составила $100 \pm 20 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$.

Каталитические свойства иммобилизованной липазы, рассчитанные ранее из полной кинетической кривой Михаэлиса-Ментен с помощью программного обеспечения Origin® (OriginLab Corp., США), такие как максимальная скорость реакции, константы Михаэлиса, каталитические константы (k , с⁻¹), зависели от химической природы носителей: для липазы, иммобилизованной на силикагеле, каталитическая константа, была в ~30 раз меньше, чем для *rPichia/lip*, адсорбированной на МУА, а именно, значения k были равны 3.7 с⁻¹ и $1.1 \times 10^2 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Максимальные активности приготовленных БКЛ, измеренные в реакции этерификации гептановой кислоты *n*-бутанолом, составили 22.3 ± 2.0 и $513.9 \pm 44.4 \text{ ЕА} \cdot \text{г}^{-1}$ для биокатализаторов PLSi и PLC соответственно [18].

Результаты систематического исследования субстратной специфичности адсорбированной *rPichia/lip* в зависимости от химической природы носителя – гидрофильного силикагеля и гидрофобного углеродного аэрогеля, представлены в виде матриц относительных активностей ($A_{\text{отн}}$) в работах [20, 21], а также в настоящей работе, в которой наиболее подробно и полно изучена субстратная специфичность биокатализаторов типа PLC по

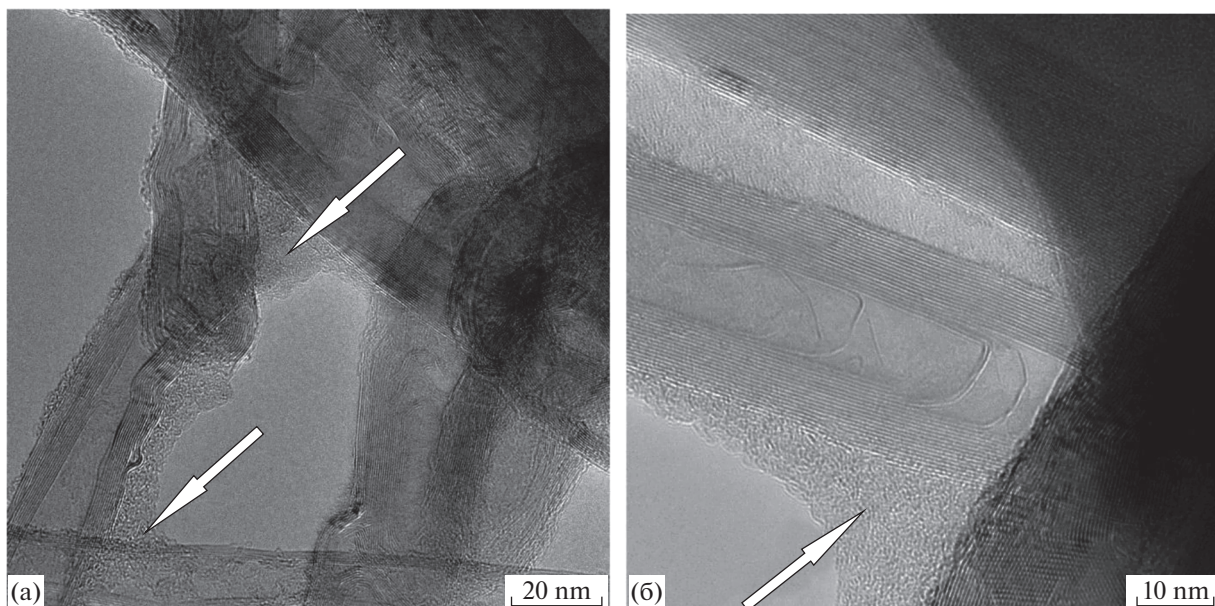


Рис. 1. ПЭМ изображения участков биокатализатора PLC типа при различных увеличениях $\times 20$ (а), $\times 10$ нм (б). Стрелками показаны аморфные отложения белковой природы (адсорбированной липазы).

отношению к высокомолекулярным субстратам S_1 (C_7 и выше). Было показано, что для обоих типов БКЛ характерной является широкая субстратная специфичность в реакции синтеза широкого набора сложных эфиров насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот и первичных алифатических спиртов в очень мягких условиях ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар), при этом за 2–4 ч достигалась конверсия кислоты не ниже 85%.

Сравнительный анализ полученных результатов также показал, что общими для двух типов БКЛ были следующие свойства: 1) скорость синтеза эфира гептановой кислоты с *n*- или *iso*-бутанолом (бутилгептаноата) была максимальной и в расчетах $A_{\text{отн}}$ принималась за 1 ед.; 2) в большинстве случаев скорость синтеза этиловых эфиров (S_2 – этанол, C_2) была минимальной по сравнению со скоростью этерификации с участием более высокомолекулярных спиртов, в том числе, пропанола, C_3 и бутанола, C_4 ; 3) скорость синтеза сложных эфиров изомеров *iso*- C_4 – C_5 кислот была на 1–2 порядка ниже по сравнению с их линейными молекулами, в то же время изомерия C_4 – C_5 спиртов практически не влияла на скорость этерификации [22]; 4) скорость реакции этерификации с участием вторичных спиртов была на порядок ниже по сравнению с первичными; третичные спирты в реакции этерификации не участвовали [20, 21].

Масштабные сравнительные исследования двух типов приготовленных биокатализаторов с использованием широкого набора пар субстратов S_1 и S_2 (более 60 пар) позволили получить многочисленные экспериментальные результаты, провести их

анализ и сделать вывод о том, как химическая природа носителей изменяет (модулирует) субстратную специфичность иммобилизованной рекомбинантной липазы. Поскольку иммобилизованная липаза более “чувствительна” к субстрату S_1 , то жирные кислоты C_7 , C_9 , C_{10} , C_{12} , C_{18} рассматривались индивидуально, а субстраты S_2 (спирты) были разделены на три группы в зависимости от их полярности, характеристикой которой является $\log P$ [28]: **группа 1** ($\log P < 1$) – это C_2 (этанол), C_3 (пропанол), C_4 (бутанол), **группа 2** ($1 < \log P < 4$) – это C_5 (пентанол), C_8 (октанол), **группа 3** ($\log P > 4$) – это C_{10} (деканол), C_{11} (ундеканол), C_{12} (додеканол), C_{16} (гексадеканол).

Наблюдаемые различия в субстратной специфичности БКЛ в зависимости от химической природы (гидрофильности/гидрофобности) носителей, используемых для адсорбционной иммобилизации *rPichia/lip*, представлены на рис. 2, где серые колонки соответствуют – биокатализаторам типа PLSi, черные колонки – типа PLC. Сравнение высоты колонок, соответствующих $A_{\text{отн}}$, позволило обнаружить следующее. Значительные различия между биокатализаторами разных типов наблюдались при синтезе этиловых эфиров (S_2 – этанол, C_2H_5OH) различных по длине ЖК: скорости реакций этерификации были значительно выше для биокатализаторов PLC типа (“*rPichia/lip* на MYA”), а именно, в 2.4–2.8 раза – для C_{4-6} кислот [21] и 1.2–1.6 раз – для C_{7-18} кислот (рис. 2). Известно, что этанол способен инактивировать различные ферменты, в том числе, иммобилизованную *rPichia/lip* [29]. Поскольку гидрофоб-

ность исходного МУА в присутствии этанола значительно уменьшалась за счет адсорбции молекул этилового спирта на УНТ, то, по-видимому, этот адсорбент обладал способностью проявлять “защитный” эффект, уменьшая локальную концентрацию C_2H_5OH в микроокружении липазы. Для другого спирта из группы 1 – бутанола, такого защитного эффекта уже не наблюдали. При сравнении величин $A_{отн}$, например, в реакции синтеза бутиловых эфиров гептановой C_7 (рис. 2а) и стеариновой C_{18} кислот (рис. 2г), оказалось, что относительная активность БКЛ типов PLSi и PLC уменьшилась в 1.3 (для C_7) и 3.5 (для C_{18}). Если S_2 относился к группе 2, то относительная скорость этерификации C_{7-18} кислот с участием БКЛ типа PLC была также существенно, в 1.5–2 раза, ниже (рис. 2), что было весьма неожиданным результатом. Если S_2 относился к группе 3, то особых различий в относительных скоростях синтеза СЭ, в большинстве случаев, не наблюдалось (рис. 2), что также являлось неочевидным фактом. Общеизвестно, что гидрофобные высокомолекулярные субстраты S_1 и S_2 обладают более высоким сродством к углеродной поверхности УНТ по сравнению с SiO_2 , их приповерхностная концентрация увеличивалась за счет гидрофобных взаимодействий с поверхностью, что могло приводить к увеличению скорости их этерификации. Однако эти же взаимодействия могли уменьшить локальную концентрацию субстратов вблизи иммобилизованной липазы или затруднять распад фермент-субстратного комплекса, или препятствовать десорбции СЭ как более высокомолекулярного и более гидрофобного по сравнению с S_1 и S_2 продукта реакции. В результате, скорость процесса этерификации в целом не увеличивалась. Таким образом, гидрофильный PLSi являлся более эффективным биокатализатором синтеза высокомолекулярных СЭ по сравнению с гидрофобным PLC.

В настоящей работе были сделаны попытки обнаружить корреляции между этерифицирующей активностью БКЛ и физико-химическими характеристиками субстратов липазы. Как видно на рис. 3а, полярность алифатических спиртов (S_2), характеризующая величиной $\log P$, линейно возрастала по мере удлинения углеродной цепи их молекул. В то же время, для изученных C_7 , C_9 и C_{12} кислот (S_1) монотонной или корреляционной зависимости активности биокатализатора от полярности S_2 не наблюдалось (рис. 3б). В результате многократных экспериментов было обнаружено, что скорость синтеза эфиров бутанола C_4 для всех изученных кислот была максимальной, а эфиров деканола C_{10} – воспроизводимо минимальной (рис. 3б). Было также показано, что деканол (дециловый спирт, C_{10}) оказывал негативное влияние как на

активность, так и на стабильность биокатализаторов типа PLSi: так, в течение семи реакционных циклов этерификации гептановой C_7 кислоты деканолом первоначальная активность БКЛ типа PLSi упала в среднем в 3 раза (рис. 4а), тогда как активность биокатализатора типа PLC за шесть реакционных циклов уменьшилась в 1.4 раза (рис. 4б). Биокатализаторы обоих типов проявляли высокую активность и стабильность в реакции синтеза бутилгептаноата (рис. 4).

Выраженное негативное влияние деканола (S_2) на функциональные свойства иммобилизованной липазы *gPichia/lip* не зависело ни от природы субстрата-кислоты (S_1), ни от физико-химических свойств адсорбентов: для БКЛ обоих типов наблюдались аналогичные зависимости, включая, минимумы в скоростях реакции этерификации с участием деканола C_{10} (рис. 3б). Наиболее “глубокий” минимум был характерен для реакции этерификации додекановой кислоты (лауриновой, C_{12}) деканолом C_{10} : так, этерифицирующая активность БКЛ в реакции синтеза децил додеканоата (рис. 3б, 2) была в 3.2 раза ниже по сравнению со скоростью синтеза бутиловых эфиров этой кислоты. Для энантовой (гептановой, C_7) и нонановой (пеларгоновой, C_9) кислот (рис. 3б, 1 и 3), различия в скоростях синтеза дециловых эфиров этих кислот составило 2.2 раза. Интересным оказался тот факт, что добавление одной CH_2 -группы в молекулу деканола приводит к 2–4-кратному увеличению активности биокатализатора (рис. 3б). Эти данные можно попытаться объяснить топологией активного центра фермента (E), а также процессами образования и распада фермент-субстратного комплекса (ES_1S_2). Расчеты с помощью программы HyperChem[®] показали, что молекулы деканола и додекановой кислоты в “растянутом” виде имеют близкие по величине размеры, равные 1.3 ± 0.2 нм. По-видимому, углеродные цепи этих субстратов взаимодействуют друг с другом наиболее эффективно за счет дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий между метиленовыми ($-CH_2-$) группами. Это может приводить как к специфической блокаде активного центра, так и к затруднениям распада комплекса ES_1S_2 . Как показали исследования, максимальные скорости этерификации наблюдали для гептановой кислоты и бутанола, возможно, из-за небольших размеров их молекул, 0.95 и 0.6 нм соответственно. При увеличении длины молекул субстратов липазы эффективность биокатализа падала. Более широкая специфичность иммобилизованной липазы по отношению к спиртовому субстрату указывала на то, что S_2 -связывающий сайт активного центра липазы по размеру более широкий, чем S_1 -связывающий, что позволило подтвердить выводы о строении активного центра липазы из *T. lanuginosus*, сле-

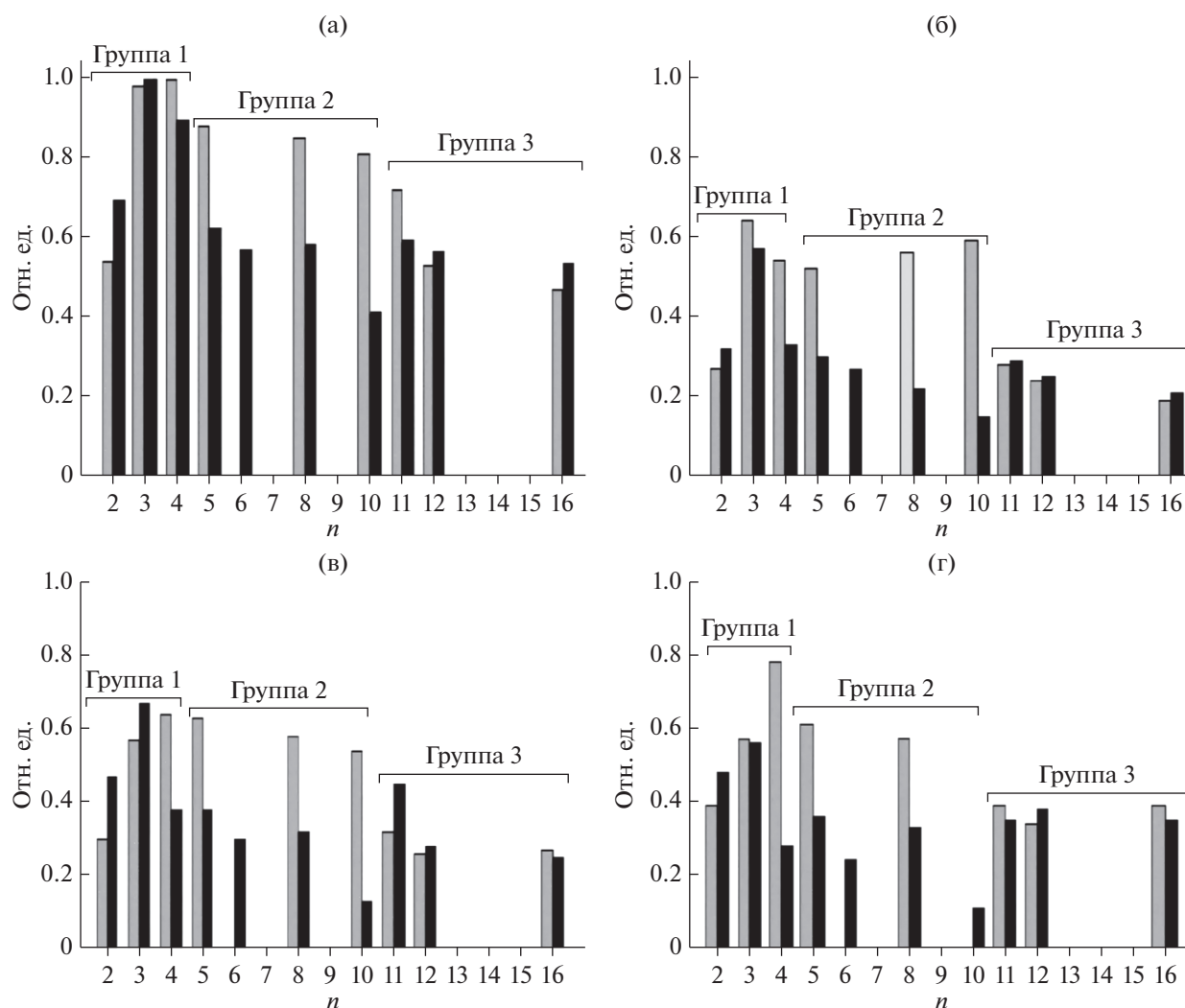


Рис. 2. Относительная активность (отн. ед.) биокатализаторов типа PLSi (серые колонки) и PLC (черные колонки) и в реакции этерификации насыщенных жирных кислот: а – гептановой (энантовой, C_7), б – нонановой, пеларгоновой, C_9), в – декановой (каприновой, C_{10}), г – октадекановой (стеариновой, C_{18}) алифатическими спиртами с различной длиной углеродного скелета (n – количество атомов углерода).

ланные в работах [27, 30–33]: активный центр липазы типа RML, к которому относится TLL, расположен близко к поверхности глобулы фермента и имеет узкую щель для S_1 (кислоты), и более широкую – для S_2 (спирта).

С целью выяснения механизма взаимодействия липазы из *T. lanuginosus* с УНТ было проведено компьютерное моделирование. Для моделирования были выбраны следующие объекты: мономер и димер TLL, одностенные углеродные нанотрубки диаметром 6.785 и 7.834 Å, длиной 50 и 100 Å. Были получены следующие результаты: 1) липаза TLL взаимодействовала с УНТ посредством гидрофобных взаимодействий остатков следующих аминокислот – лизина, аргинина, аспарагина, пролина, и π -катионных взаимодействий с остатком лизина (табл. 1, рис. 5); 2) энер-

гия взаимодействия между димером липазы и нанотрубкой не зависела от длины УНТ и составила -28 ккал \cdot моль $^{-1}$; 3) энергия взаимодействия мономера TLL с углеродной нанотрубкой 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 \cdot моль $^{-1}$ (в расчете на мономер); 5) УНТ связывалась в щели между двумя мономерами липазы (рис. 6); 6) активные центры димера TLL, состоящего из мономеров А и Б, находились на расстоянии на 6.6 и 25.8 Å (0.66 и 2.58 нм) от УНТ (рис. 6). В этом случае для объяснения наблюдаемых максимума и минимума на кривых рис. 3б, можно также предположить, что для низкомолекулярных C_{4-7} субстратов доступны оба активных центра иммобилизованной

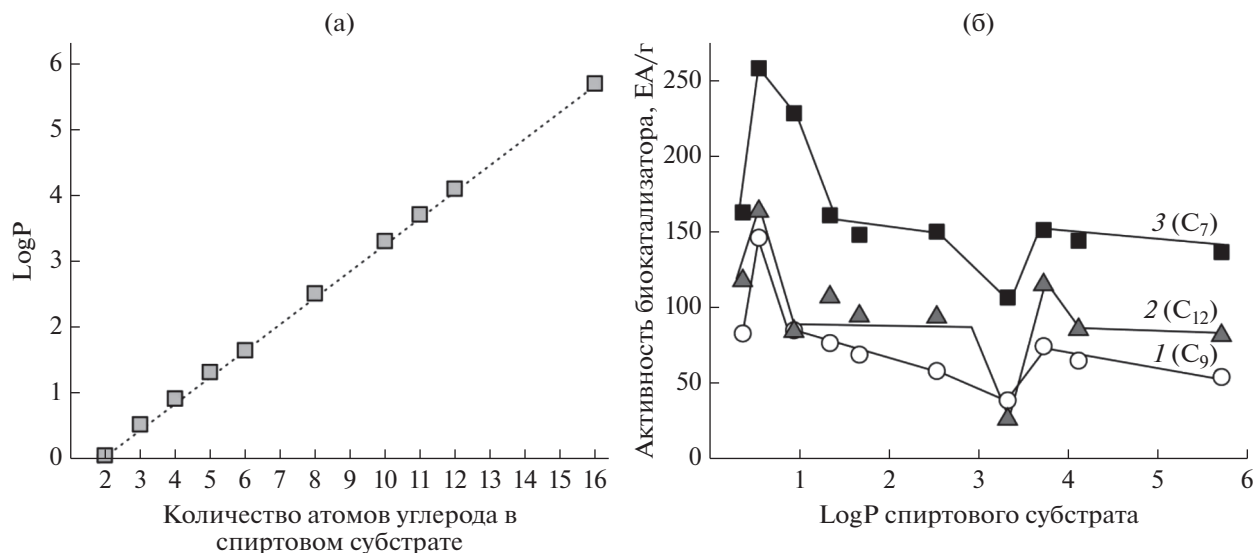


Рис. 3. Полярность ($\log P$) спиртовых субстратов S_2 в зависимости от количества атомов углерода в молекуле (а), зависимость активности биокатализатора “*rPichia/lip* на МУА” от параметра $\log P$ (б) в реакции синтеза сложных эфиров: 1 – нонановой (пеларгоновой, C_9), 2 – додекановой (лауриновой, C_{12}), 3 – гептановой (энтановой, C_7) кислот.

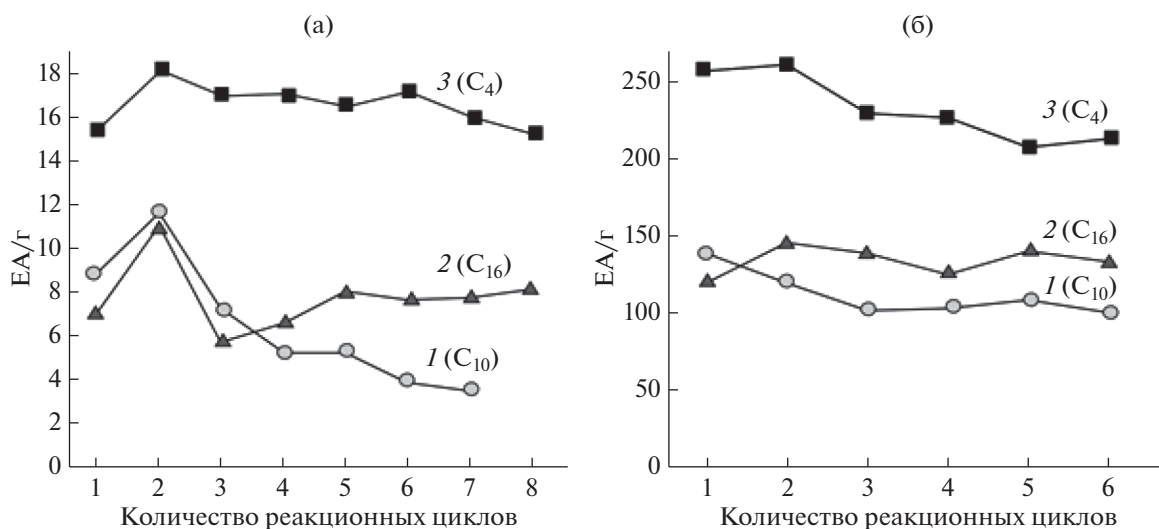


Рис. 4. Зависимость активности (EA · г) биокатализаторов “*rPichia/lip* на силикагеле” (PLSi) (а) и “*rPichia/lip* на МУА” (PLC) (б) от количества реакционных циклов этерификации гептановой C_7 кислоты спиртами: 1 – дециловым (C_{10}), 2 – гексадециловым (цетиловым, C_{16}), 3 – бутиловым (C_4).

липазы, тогда как для высокомолекулярных субстратов с количеством атомов углерода выше 10, доступен преимущественно один активный центр, находящийся на расстоянии 25.8 нм от УНТ (рис. 6а).

Таким образом, в данной работе было установлено, что функциональные свойства иммобилизованной рекомбинантной липазы *rPichia/lip*, такие как активность и субстратная специфичность, изменялись (модулировались) в зависимости от химической природы носителя. Приготовленные БКЛ существенно различались по каталитическим

свойствам: активность и каталитическая константа для биокатализатора “*rPichia/lip* на SiO_2 ” (тип PLSi) были в 20–30 раз ниже, чем для “*rPichia/lip* на МУА” (тип PLC). Несмотря на широкую субстратную специфичность обоих типов БКЛ, синтез этиловых эфиров насыщенных монокарбоновых кислот протекал более эффективно с участием гидрофобного БКЛ типа PLC, тогда как синтез высокомолекулярных эфиров с выраженной гидрофобностью – с участием гидрофильного типа PLSi. Для обоих типов приготовленных

Таблица 1. Взаимодействия между димером TLL, состоящим из двух мономеров А и В, и одностенной УНТ*

Аминокислотный остаток	Длина связи	Атом УНТ		Атом белка
Гидрофобные взаимодействия				
24А	LYS	3.43	5195	226
24А	LYS	3.22	5150	227
24В	LYS	3.34	5117	2763
29А	PRO	3.67	5508	277
84А	ARG	3.83	5226	761
84В	ARG	3.54	5437	3295
Взаимодействие с аспарагином				
26В	ASN	3.92	5428	2786
π-Катионные взаимодействия				
24В	LYS	5.38	5118, 5119, 5120, 5121, 5163, 5165	

* Длина углеродной нанотрубки 50 Å.

биокатализаторов максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой C_7 кислоты бутиловым спиртом, а минимальная – бутановой кислоты дециловым C_{10} спиртом. Приготовленные активные и стабильные биокатализаторы PLSi и PLC типов, несомненно, обладают высоким практическим потенциалом для “зеленых” процессов низкотемпературного синтеза разнообразных сложных эфиров.

Авторы благодарят Кузнецова В.Л. за предоставленные образцы МУА, Рудину Н.А. и Ищен-

ко А.В. за проведение электронно-микроскопических исследований биокатализаторов PLC типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект НИР 0239-2021-0005).

Работы по молекулярному моделированию проведены в рамках государственного задания Севастопольского государственного университета (проект НИР FEFM-2020-0003).

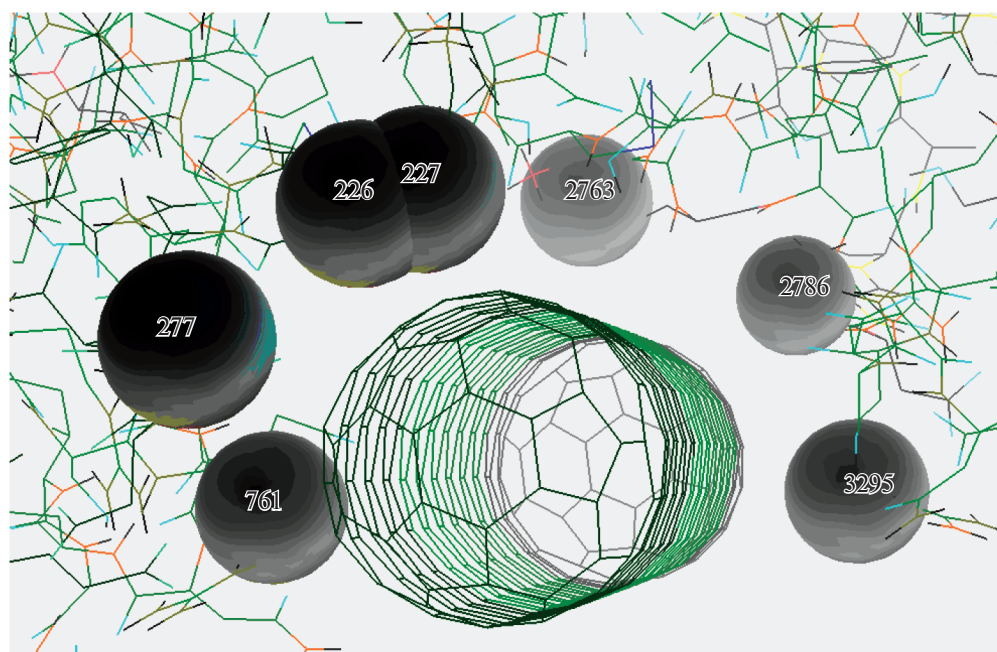


Рис. 5. Докинг димера TLL с одностенной УНТ длиной 50 Å, диаметром 7.834 Å ($n = 10, m = 0$). Указаны атомы, которые непосредственно взаимодействуют с УНТ. Атомам 226, 227, 761, 2763, 2786, 3295 (из табл. 1) соответствуют атомы углерода в CH_2 , 277 – атом углерода в CH .

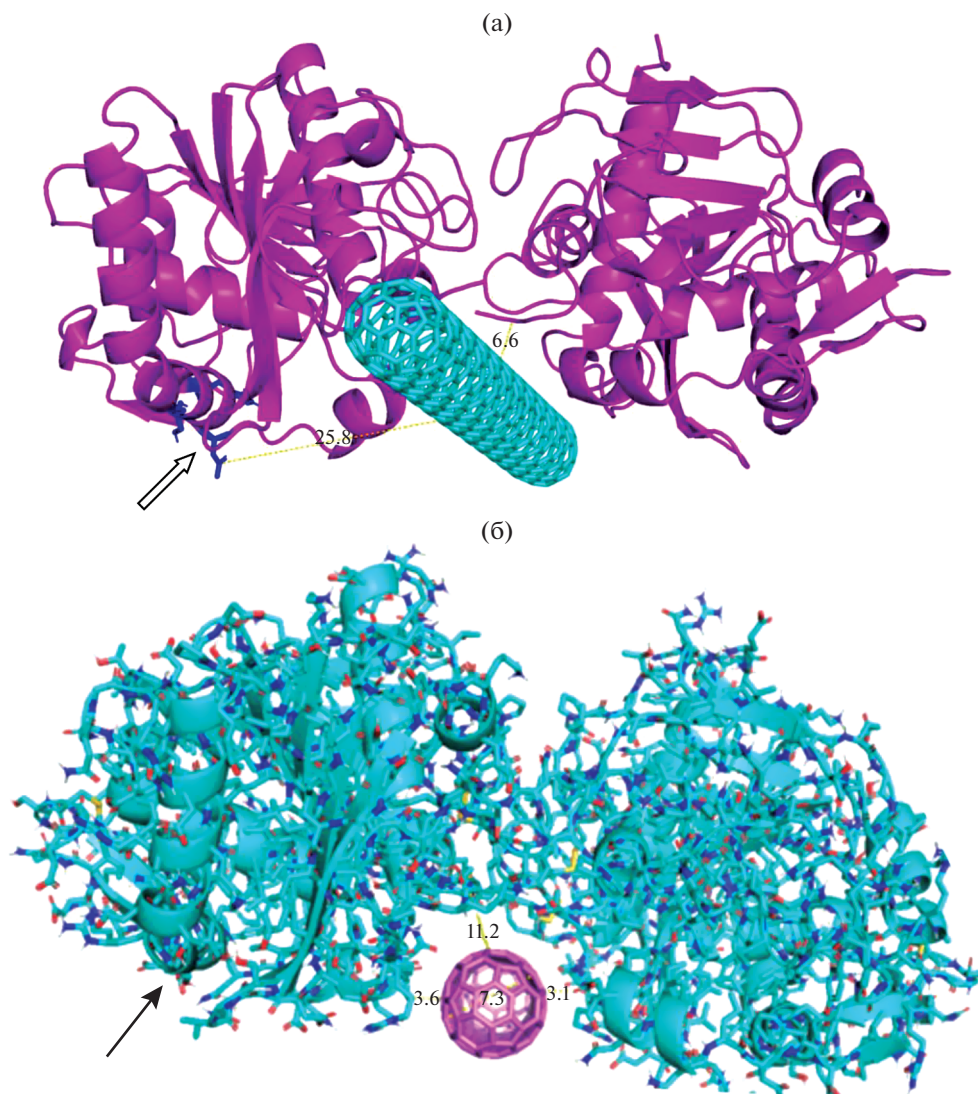


Рис. 6. Докинг димера TLL с одностенной УНТ длиной 50 Å, диаметром 7.834Å ($n = 10$, $m = 0$). Стрелка указывает на активный центр фермента. Указаны расстояния между активным центром липазы (Asp96-His110-Ser115) и УНТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. V. 40. P. 1451–1463.
- Sokolovskii V.D., Kovalenko G.A. // *Biotechnol. Bioeng.* 1988. V. 32. P. 916–919.
- Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V., Valdez B. / Ed. Stoytcheva M., Montero G. // *Biodiesel – Feedstocks and Processing Technol. InTech*, 2011. P. 397–410.
- Luna C., Garson-Perez V., Lopez-Tenllado F.J., Baustista F.M., Verdugo-Escamilla C., Aguado-Dedlas L. et al. // *Catalysts*. 2021. V. 11. P. 1350–1362. <https://doi.org/10.3390/catal11111350>
- Hernandez-Martin E., Otero C. // *Bioresource Technol.* 2008. V.99. P. 277–286.
- Li D., Adhikari P., Shin J.-A., Lee J.-H., Kim Y.-J., Zhu X.-M., et al. // *Food Sci. Technol.* 2010. V. 43. P. 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.013>
- Lopez-Hernandez A., Otero C., Hernandez-Martin E., Garcia H. S., Hill C. G., Jr. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007. V. 109. P. 1147–1159.
- Osorio N.M., Gusmao J.H., Manuela da Fonseca M., Ferreira-Dias S. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005. V. 107. P. 455–463.
- Handbook of Industrial Catalysis*. /Ed. C.T. Hou. Boca Raton: CRC Press, 2005. 500 p.
- Bucholdz K., Kasche V., Bornscheuer U.T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005. 447 p.
- Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*. Ed. J. Tao, R. Kazlauskas. John Wiley & Sons, 2011. 479 p.

12. Безбородов А.М., Загустина Н.А., Понов В.О. // Прикл. биохимия микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 347–373.
13. Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 57. P. 171–176.
14. 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. 339–353.
15. Silveira E.A., Moreno-Perez S., Basso A., Serban S., Mamede R.P., Tardioli P.W., Farinas C.S. et al. // BMC Biotechnol. 2017. V. 17. P. 88–101.
16. Bohr S.S., Lund P.M., Kallenbach F.S., Pinholt Y., Thomsen J., Iversen L. et al. // Scientific Reports. 2019. V. 9. P. 16169–16180. doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-52539-1
17. Нуруллина П.В., Перминова Л.В., Коваленко Г.А. // Вестн. Моск. ун-та. сер. 2. Химия. 2020. Т. 61. № 2. С. 134–140. https://doi.org/10.3103/S0027131420020108
18. Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Перминова Л.В., Коваленко Г.А. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 5. С. 5–19. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-5-62
19. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Krasnikov D.V., Kuznetsov V.L. // J. Porous Mater. 2018. V. 25. P. 1017–1026. DOI: 10.1007/s10934-017-0512-0
20. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. // Reac. Kinet. Mech. Catal. 2019. V. 128. P. 479–491. https://doi.org/10.1007/s11144-019-01648-z
21. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhina M.B., Beklemishev A.B. // Biocatal. Agr. Biotechnol. 2021. V. 36. 102124. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102124
22. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhina M.B., Beklemishev A.B. // Catalysis Today. 2021. V. 379. P. 36–41. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018
23. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Шашков М.В., Беклемишев А.Б. // Кинетика и катализ. 2022. Т. 63. № 2. С. 212–222. https://doi.org/10.31857/S0453881122020046
24. Bearden J. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 533. P. 525–529.
25. Kuznetsov V.L., Suslyayev V.I., Dorofeev I.D., Kazakova V.F., Moseenkov S.I., Smirnova T.E., Krasnikov D.V. // Phys. Status Solidi B. 2015. V. 252. № 11. P. 2519–2523. https://doi.org/10.1002/pssb.201552254
26. Патент RU 2 577 273 С1. Бюл. № 7. 2016.
27. Kumar M., Mukherjee J., Sinha M., Kaur P., Sharma S., Gupta M.N., Singh T.P. // Sustain Chem Process. 2015. V. 3. 10 p. https://doi.org/10.1186/s40508-015-0042-5
28. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C. // Biotechnol. Bioeng. 1987. V. 30. P. 81–87.
29. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Яковлева Е.Ю., Пыхтина М.Б. // Катализ в промышленности. 2014. № 6. С. 71–79.
30. Palomo J.M., Ortiz C., Fuentes M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1038. P. 267–273. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.058
31. Naik S., Basu A., Saikia R., Madan B., Paul P., Chatterjee R., Brask J., Svendsen A. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 65. P. 18–23. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.002
32. Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. P. 197–212. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010
33. Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. P. 15–32. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008

Modulation of the Catalytic Properties of Immobilized Recombinant Lipase from *Thermomyces lanuginosus* in the Reaction of Esterification by the Selection of the Adsorbent

G. A. Kovalenko^{a, *}, L. V. Perminova^a, A. B. Beklemishev^{a, b}, M. B. Pykhtina^b,
M. G. Holyavka^{c, d}, V. A. Buchelnikova^d, and V. G. Artyukhov^c

^a Boreskov Institute of Catalysis, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia

^c Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

^d Sevastopol State University, Sevastopol, 299053 Russia

*e-mail: galina@catalysis.ru

Biocatalysts with lipase activity (BLA) were prepared by adsorptive immobilization of recombinant lipase (designated rPichia/lip) from thermophilic microscopic fungi *Thermomyces lanuginosus* produced by a genetically engineered strain of methylotrophic yeast *Komagataella phaffia* (*Pichia pastoris*). Supports with different physicochemical properties such as hydrophilic mesoporous silica (SiO₂) and hydrophobic macroporous carbon aerogel (MCA) were used as adsorbents. The enzymatic activity, substrate specificity, and operational stability of BLA have been systematically studied in the esterification of saturated fatty acids and aliphatic alcohols with the number of carbon atoms in the molecule from 2 to 18. Matrices of relative activities were compiled for more than 60 pairs of substrates – acid and alcohol, by comparing the rates of the esterification un-

der similar conditions, which made it possible to identify differences in the specificity of BLA depending on the chemical nature of the adsorbents. It was found that for both types of biocatalysts, “*rPichia*/lip on SiO_2 ” (denoted PLSi) and “*rPichia*/lip on MCA” (denoted PLC), the maximum reaction rate was observed when heptanoic acid (C7) was esterified with butyl alcohol (C4). Under the same conditions for the synthesis of esters ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 bar, an organic solvent – a mixture of hexane and diethyl ether), in particular, butyl heptanoate, *rPichia*/lip adsorbed on silica showed an order of magnitude lower activity than lipase adsorbed on carbon aerogel. The catalytic constants, equal to 3.7 s^{-1} and $1.1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, respectively, differed by a factor of 30. It was found that esters of short chain fatty acids $\text{C}_4\text{--}\text{C}_7$ and ethyl alcohol were synthesized 2–3 times faster with the hydrophobic PLC type biocatalysts than with the hydrophilic PLSi type. At the same time, esters of high molecular weight $\text{C}_9, 10, \text{C}_{18}$ acids and $\text{C}_8\text{--}\text{C}_{16}$ alcohols, which exhibit pronounced hydrophobicity, were synthesized 1.5–2 times faster with PLSi type biocatalysts. The operational stability of the prepared biocatalysts was quite high: the prepared BLAs retained 82–99% of their initial activity after more than 30 reaction cycles, and the duration of each cycle to reach an acid conversion above 85% was several hours (4–6 h).

Keywords: recombinant lipase from *Thermomyces lanuginosus*, silica, carbon aerogel, adsorption of lipase, biocatalysts, esterification, catalytic properties