

Межфакультетский учебный курс
«Микроорганизмы, ферменты и медицина. Новые возможности»

ЛИПАЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Еремеев Николай Леонидович

доктор химических наук, профессор

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии*

nleremeev@gmail.com

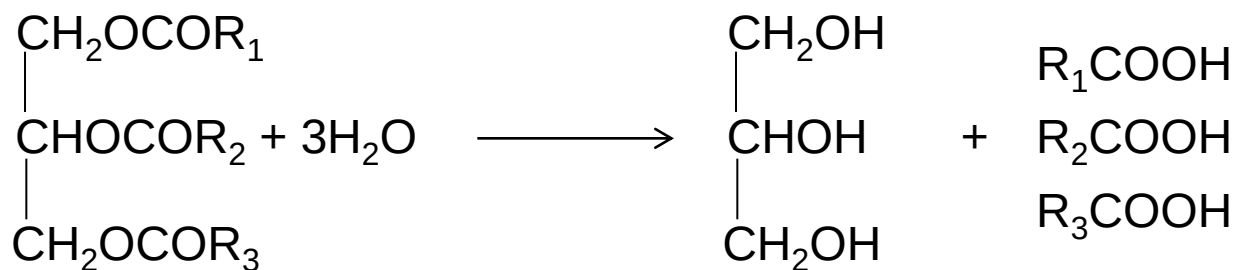
«В промышленном применении наиболее значимыми ферментами являются гидролазы (амилазы, протеиназы, липазы). Липазы применяются максимально широко ввиду их высокой каталитической активности, стабильности и способности катализировать большое количество самых разнообразных реакций»

Filho D.G., Silva A.G., Guidini C.Z. Lipases: sources, immobilization methods and industrial applications. – Appl.Microbiol.Biotechnol., 2019, 103: 7399-7423.

фермент	Процесс	Объем продукции (тонн/год*завод)
Глюкозоизомераза	Получение сиропов с высоким содержанием фруктозы из пшеничных гидролизатов	10^7
Липаза	Переэтерификация пищевых масел	10^5
Лактаза	Гидролиз лактозы	10^5
Липаза	Производство биодизельного топлива	10^4
Пенициллин G ацилаза	Получение антибиотиков	10^4
Аспартаза	Получение L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты	10^4
Термолизин	Синтез аспартама	10^4
Липаза	Разделение хиральных спиртов и аминов	10^3

DiCosmo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. - Chem. Soc. Rev., 2013, 42(15): 6434-6474

Триглицериды - природные жиры и масла
(сложные эфиры глицерина и жирных кислот)



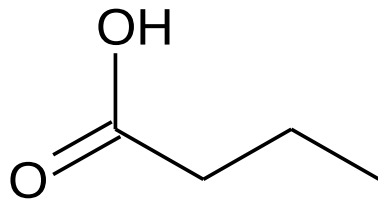
Физиологическая роль липазы (ЕС 3.1.1.3 – триацилглицерол-липаза) - гидролиз триглицеридов

Класс 3 – гидролазы

Подкласс 1 – действуют на сложноэфирные связи

Подподкласс 1 – гидролазы эфиров карбоновых кислот

Жирные кислоты – цепь не менее 4 атомов углерода

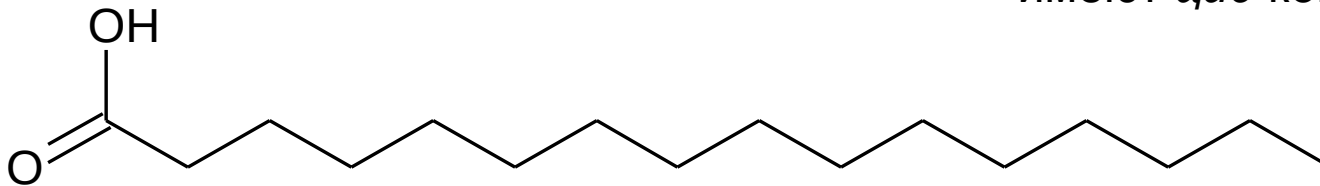


Масляная (C 4:0)

число атомов углерода четное

могут иметь одну или несколько
двойных связей

все двойные связи
имеют *цис*-конфигурацию



Пальмитиновая (C 16:0)

Миристиновая (C 14:0)

Стеариновая (C 18:0)

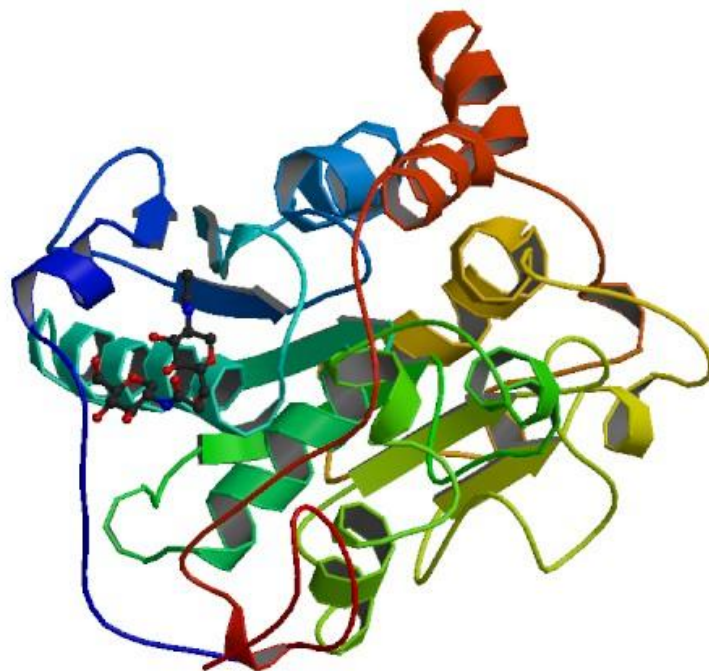
Олеиновая (C 18:1; 9)

Линолевая (C 18:2; 6, 9)

Линоленовая (C 18:3; 3, 6, 9)

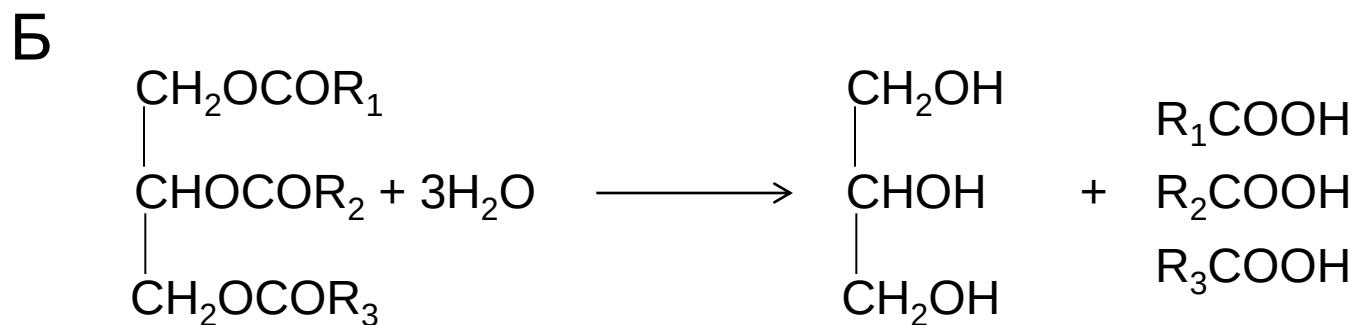
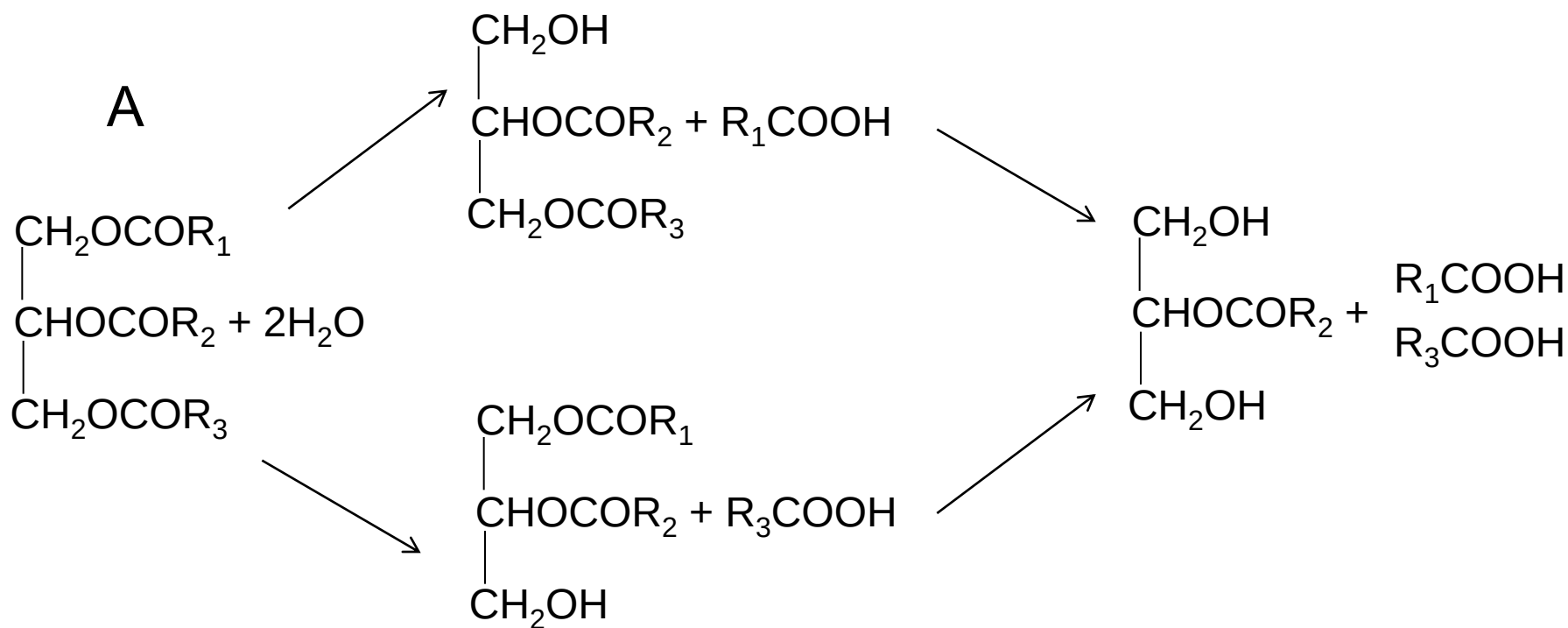
Арахиновая (C 20:0)

Арахидоновая (C 20:4; 6, 9, 12, 15)



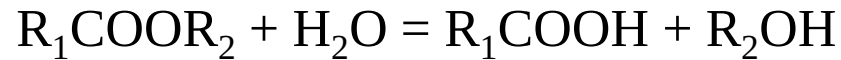
3D структура липазы В из *Candida antarctica*

Каталитическая **триада** – **Ser/His/Asp**



Гидролиз триглицеридов под действием *sn*-1,3-специфичных (А) и неспецифичных (Б) липаз

Гидролиз жиров и масел

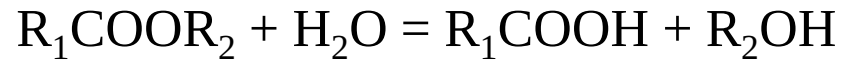


Пищеварительные ферментные средства

Ароматизация продуктов питания
(пищевая добавка E1104)

Моноацилглицериды – эмульгаторы
(компонент пищевой добавки E471)

Гидролиз жиров и масел



Стиральные порошки

Косметические средства ухода за кожей и волосами

Утилизация маслосодержащих отходов производства

Обезжиривание шкур

Обезжиривание бумажной пульпы

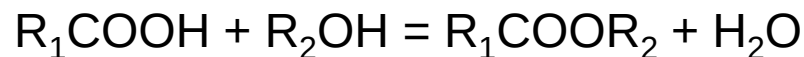
Обезжиривание хлопкового волокна

(в 2001 году компания Novozyme за данную технологию получила премию

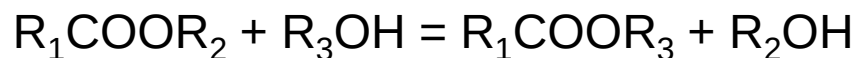
Presidential Green Chemistry Challenge Award от EPA США)

Реакции липаз в средах с низким содержанием воды

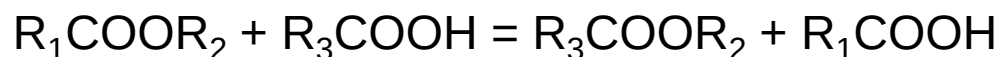
Этерификация



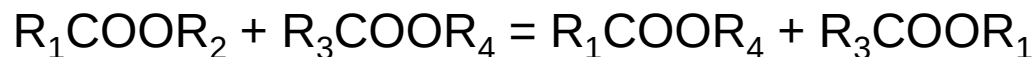
Трансэтерификация – алкоголиз



Трансэтерификация – ацидолиз



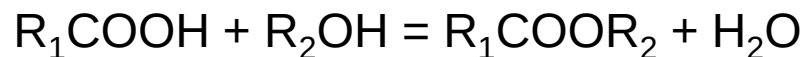
Интерэтерификация



Аминолиз



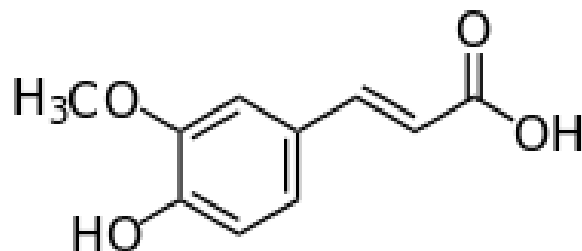
Этерификация



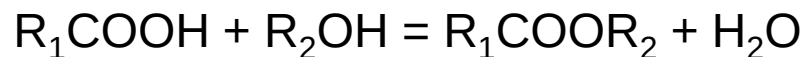
Ароматизаторы (пищевая промышленность, косметика, освежающие и ароматизирующие средства)

Бутилацетат	банан, груша (от концентрации)
Гексилацетат	фруктовый запах
Изоамилацетат	грушевый запах
Этилвалерат	запах зеленых яблок
Метилантранилат	апельсиновый запах

Ультрафиолетовые фильтры (кремы против загара, отбеливатели кожи) –
глицериды феруловой кислоты



Этерификация

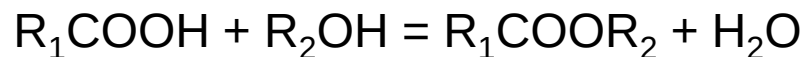


Пищевые эмульгаторы - 1,3-диацилглицериды –
(компонент пищевой добавки E471) –
этерификация глицерина жирными кислотами

Неионные ПАВ на основе эфиров сахаров
(косметическая промышленность) –
фруктозобутират, сорбитолмоностеарат

Функциональные антиоксиданты –
эфиры жирных кислот и витамина А – ретинола,
витамина С – аскорбиновой кислоты, диметиламиноэтанола

Этерификация



Увлажняющие эфиры для косметики
(заменители минеральных или вазелинового масел)

Миристилмиристат

Децикокоат

Цетилприцинолеат

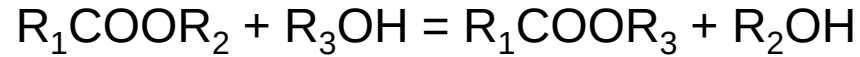
Олеилэрукат

Изоамилкокоат

2-Этилгексилпальмитат

(в 2009 году компания Eastmen Chemical Co. за данную технологию получила премию Presidential Green Chemistry Challenge Award от EPA США)

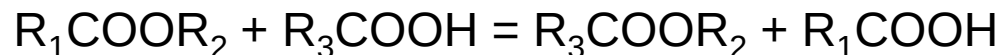
Трансэтерификация – алкоголиз



Биодизельное топливо (метилловые эфиры жирных кислот) - метанолиз растительных масел или отходов пищевой промышленности

Диацилглицериды – глицеролиз растительных масел

Трансэтерификация – ацидолиз



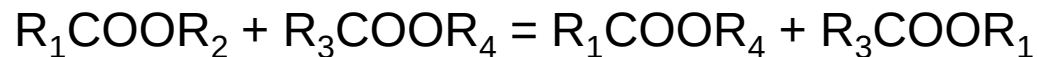
Свободный от транс-изомеров маргарин – ацидолиз подсолнечного масла смесью стеариновой и пальмитиновой кислот

(в 2005 году компании ADM и Novozyme за данную технологию получила премию Presidential Green Chemistry Challenge Award от EPA США)

«Структурированные липиды» –
ацидолиз пальмового масла смесью
докозагексаеновой и арахидоновой кислот

L-аскорбиллактат – ацидолиз этиллактата аскорбиновой кислотой

Интерэтерификация



Диацилглицериды – интерэтерификация рапсового масла моноацилглицеридами различного состава

Кулинарные масла – интерэтерификация рисового и пальмового масел

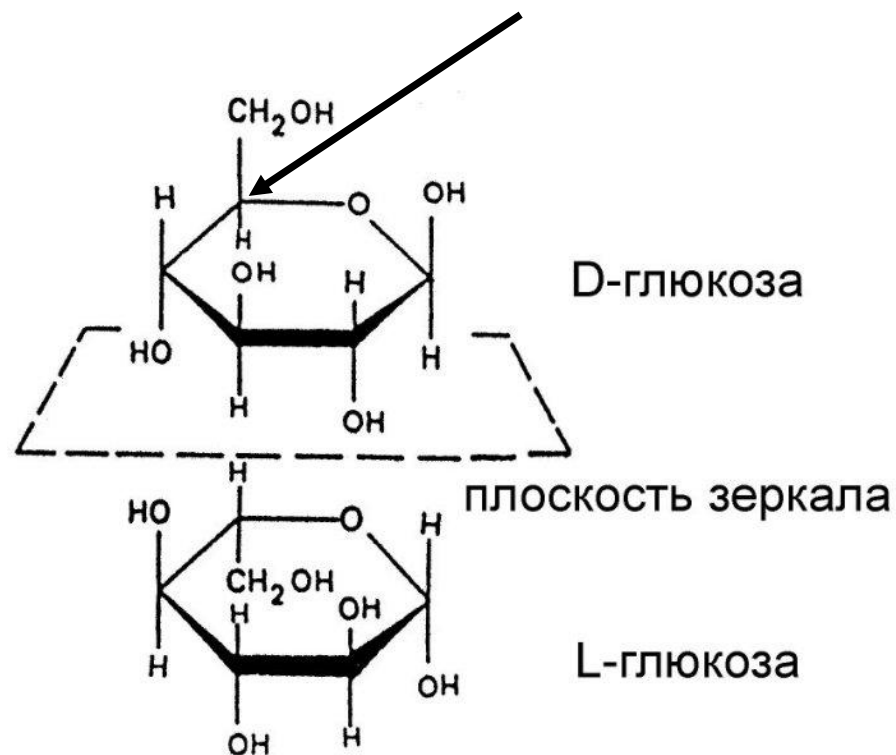
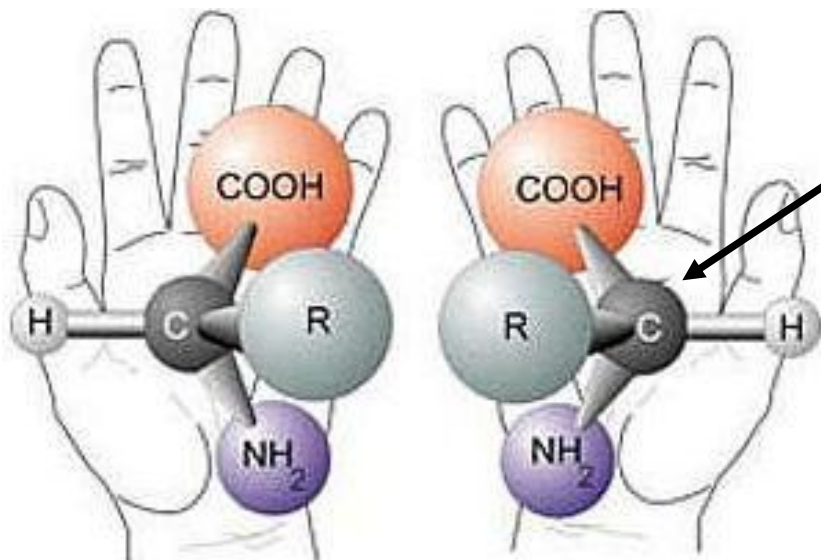
Искусственное масло какао – интерэтерификация пальмового масла тристеарином

Аминолиз

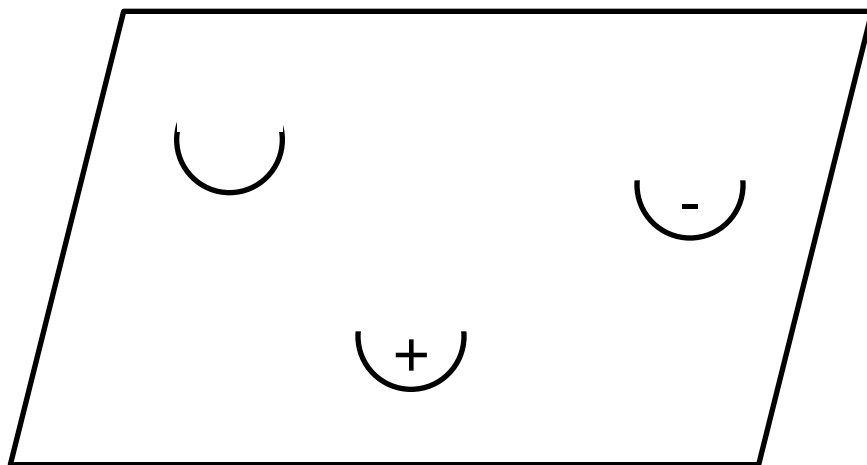
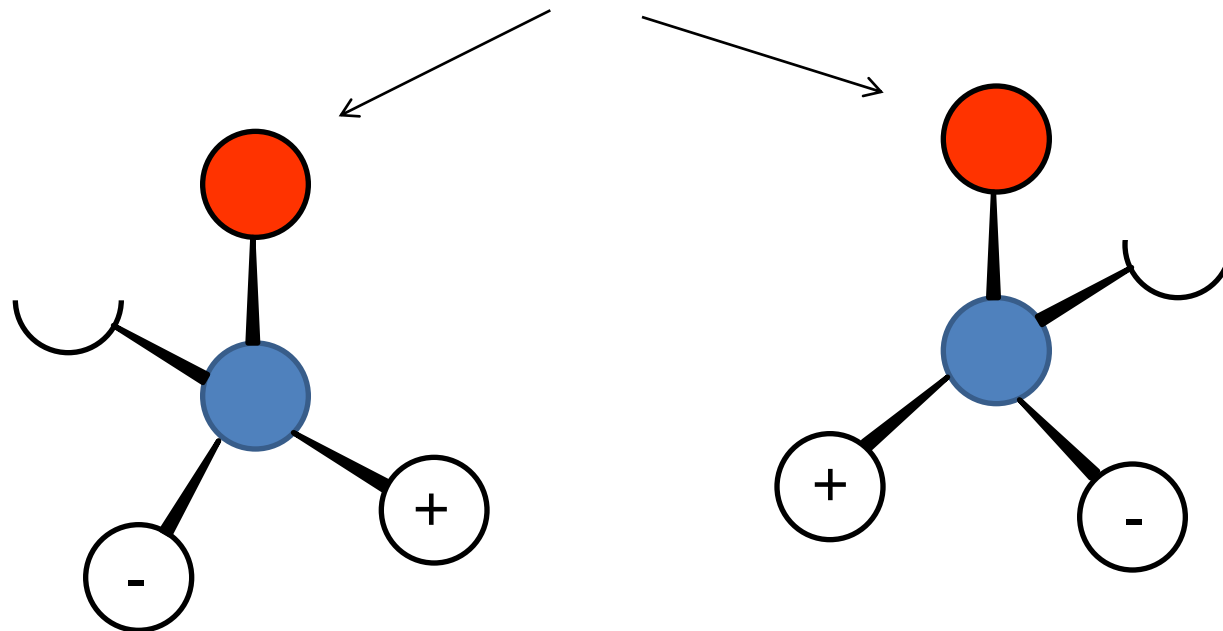


N-ацилированные аминокислоты –
ПАВ для косметической промышленности

Хиральность

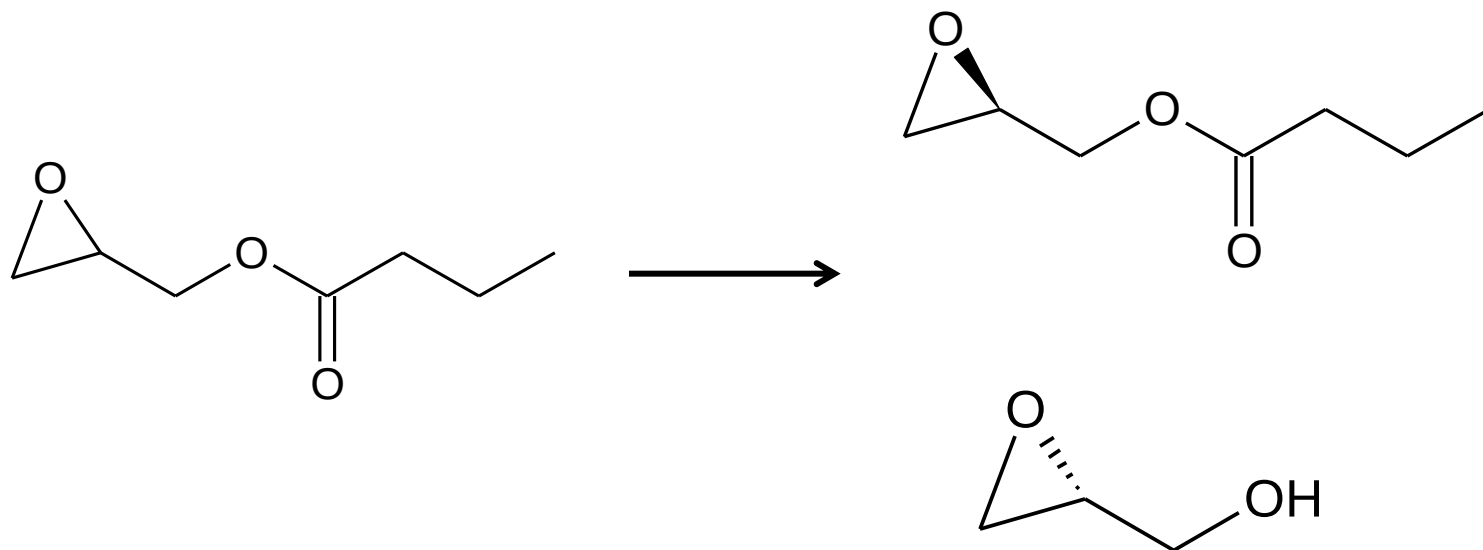


Атакуемая группа



Стереоселективный гидролиз глицидилбутирата

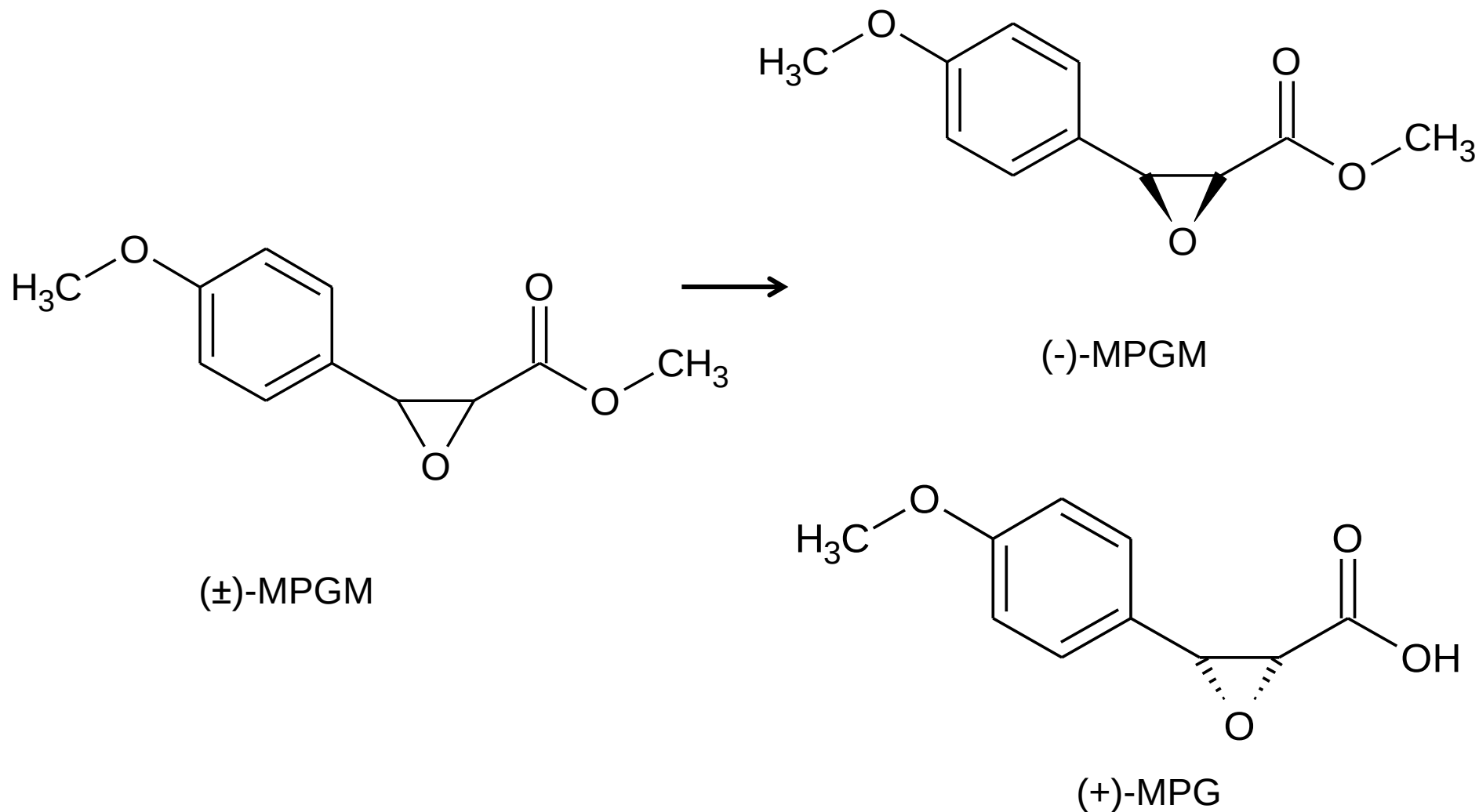
(Lander W.E., Whitesides G.M. Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols. - J. Am. Chem. Soc., 1984, 106(23): 7250-7251)

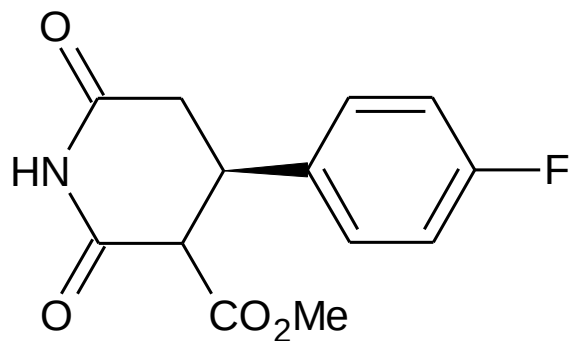


Выход (*R*)-энантиомера глицидола под действием свиной панкреатической липазы составляет 89% при оптической чистоте продукта ее 92%.

Компания Andeno-DSM использует этот процесс для крупнотоннажного получения (*R*)-глицидола (промежуточный продукт для синтеза β -адреноблокаторов).

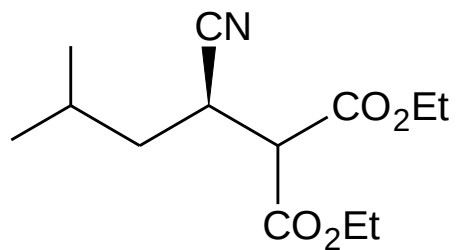
Стереоселективный гидролиз метилового эфира
(±)-3-(4'-метоксифенил)глицидиловой кислоты
(липаза из *S. marcescens*)





Полупродукт для получения пароксетина
(антидепрессант).

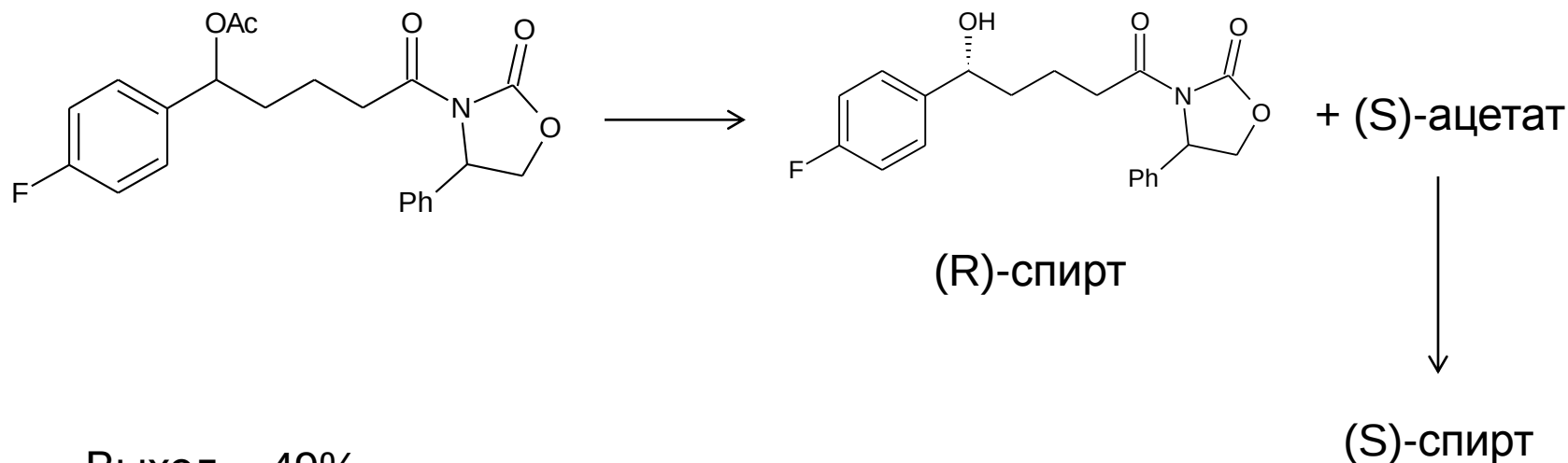
Мощность производства – более 100 кг в год
(BioVerdant, WO/2009/005647)



Полупродукт для получения прегабалина
(противоэпилептическое средство).

Мощность производства – более 100 тонн в год
(Pfizer, WO/2006/000904)

Полупродукт для получения эзетимиба
(ингибитор абсорбции холестерина в кишечнике)

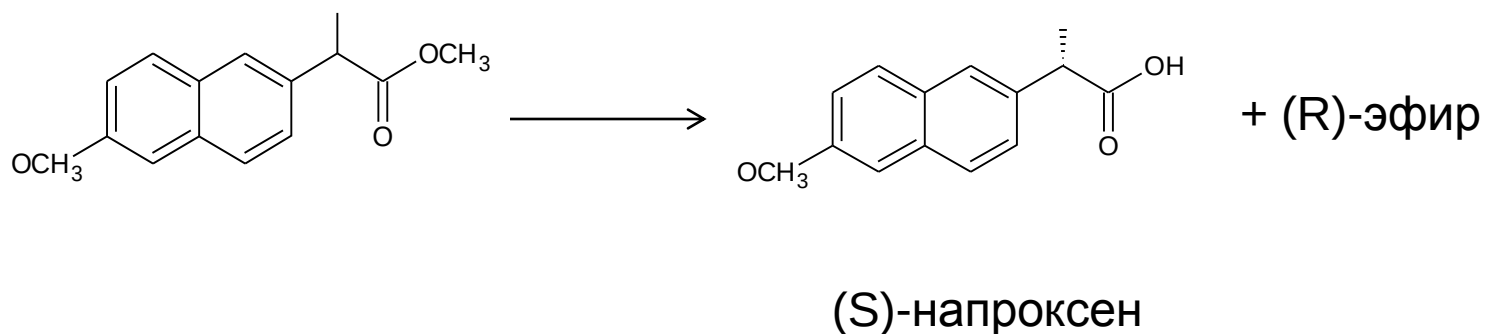


Выход – 49%

Оптическая чистота S-изомера – 98,5%

Singh, A.; Goel, Y.; Rai, A.K.; Banerjee, U.C. Lipase catalyzed kinetic resolution for the production of (S)-3-[5-(4-fluoro-phenyl)-5-hydroxy-pentanoyl]-4-phenyl-oxazolidin-2-one: An intermediate for the synthesis of ezetimibe. *J. Mol. Catal. B*, **2013**, 85–86, 99–104

Разделение изомеров напроксена –
нестероидного противовоспалительного препарата.
(S)-изомер в 28 раз активнее (R)-изомера

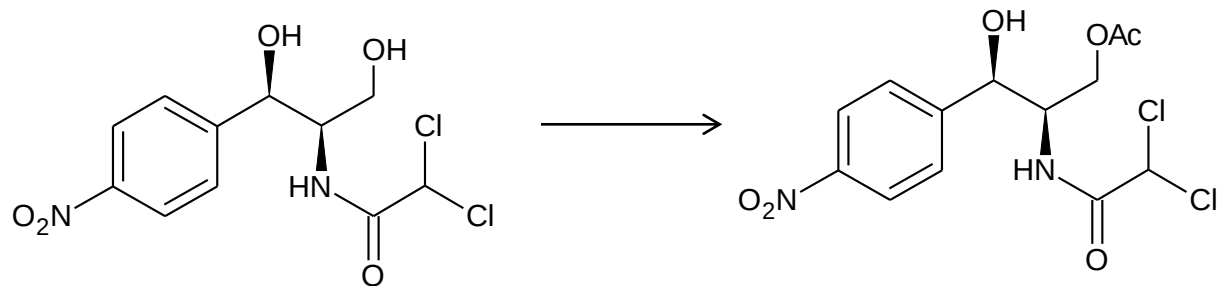


Выход – 49%

Оптическая чистота S-напроксена – более 98%

Sayin, S.; Akoz, E.; Yilmaz, M. Enhanced catalysis and enantioselective resolution of racemic naproxen methyl ester by lipase encapsulated within iron oxide nanoparticles coated with calix[8]arene valeric acid complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 6634–6642

Получение эфира хлорамфеникола (антибиотик)



Выход – 94-98%

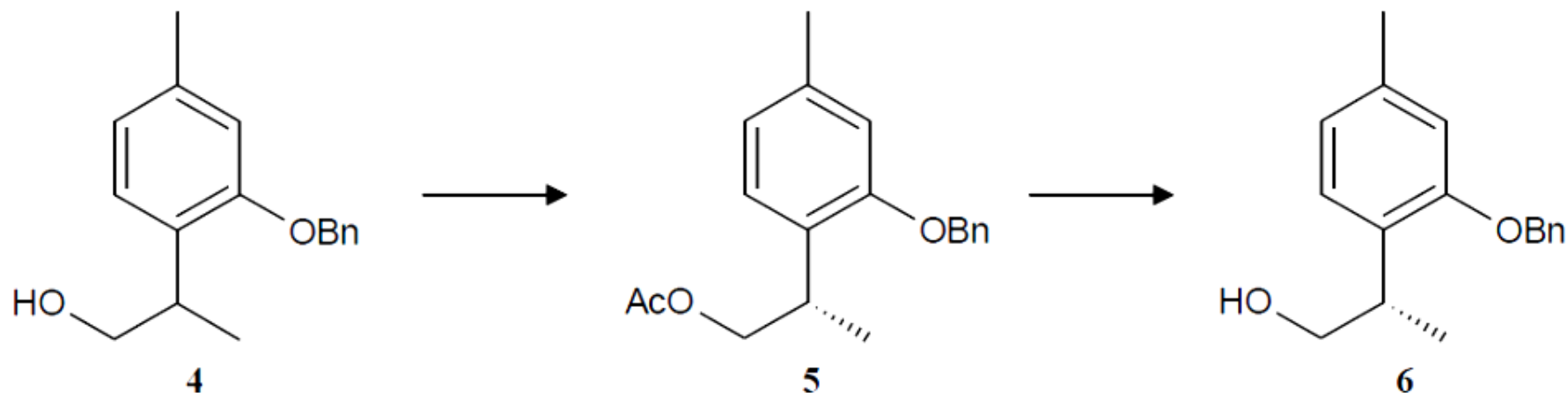
Оптическая чистота продукта – более 99%

Bizerra, A.M.C.; Montenegro, T.G.C.; Lemos, T.L.G.; de Oliveira, M.C.F.; de Mattos, M.C.; Lavandera, I.; Gotor-Fernandez, V.; Gonzalo, G.; Gotor, V. Enzymatic regioselective production of chloramphenicol esters. *Tetrahedron* **2011**, 67, 2858–2862

Получение S-теспезона

Стереоселективное ацилирование

Стереоселективный гидролиз в водной среде

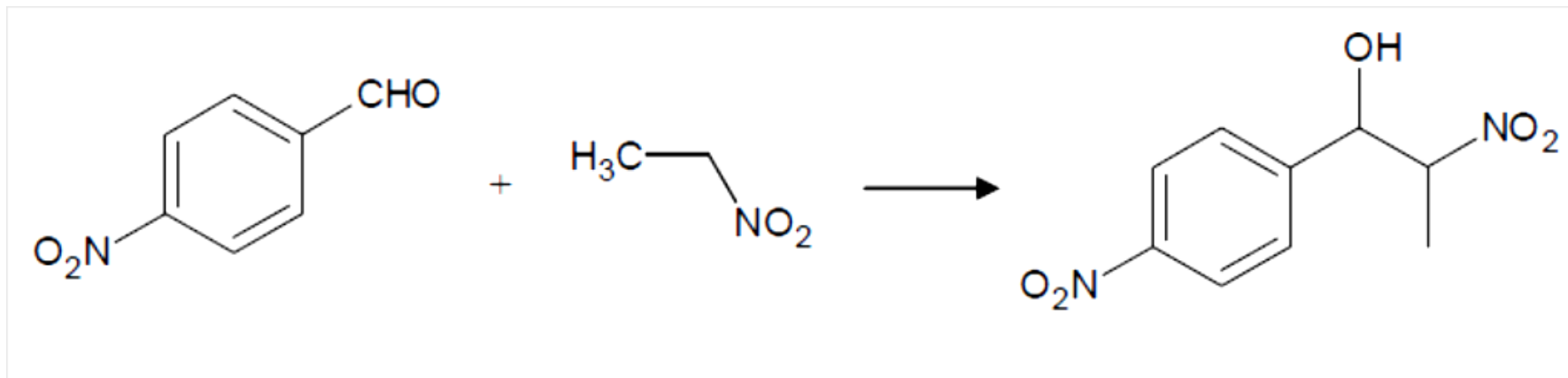


Оптическая чистота S-изомера **6** - 98%

Breyer, S.; Effenberger-Neidnicht, K.; Schobert, R. Total synthesis and anticancer activities of (-)- and (+)-thespesone. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75(18), 6214-6218

Реакция Анри

(реакция между альдегидом и нитроэтаном с получением β-нитроалканолов – полупродуктов промышленного синтеза фунгицидов и некоторых антибиотиков)



Фермент

Выход, %

-

Не определяется

Свиная панкреатическая липаза (СПЛ)

65,0

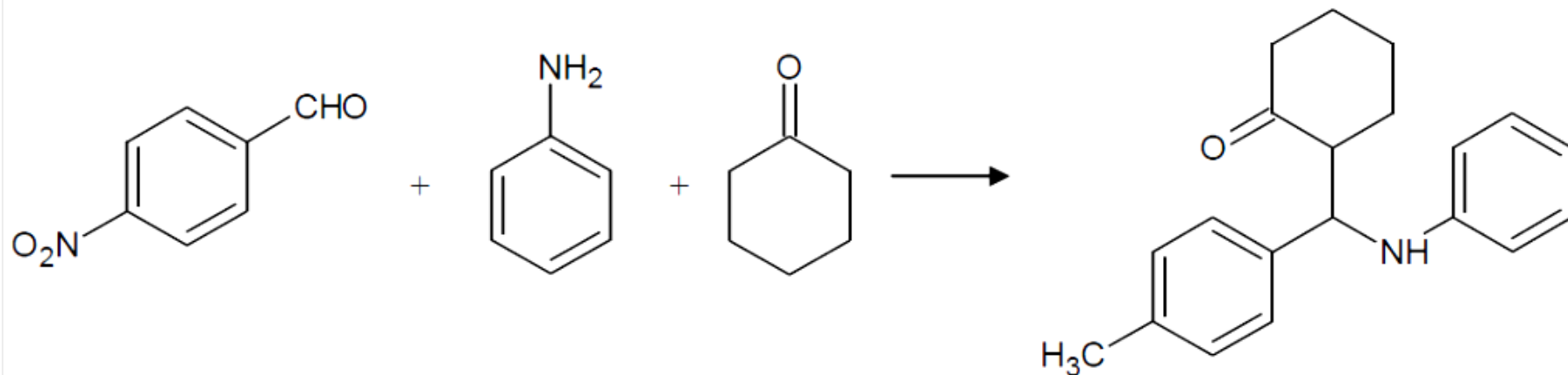
Amano lipase M (липаза из *M.javanticus*)

75,0

Wang, J.-K.; Li, X.; Xie, H.-Y.; Liu, B.-K.; Lin, X.-F. Hydrolase-catalyzed fast Henry reaction of nitroalkanes and aldehydes in organic media // J. Biotechnol. – 2010. – V.145, N 3. - P. 240-243

Реакция Манниха

(получение β -аминокарбонильных соединений –
полупродуктов для синтеза различных биологически активных соединений)



Фермент

Выход, %

-

Не определяется

Свиная панкреатическая липаза (СПЛ)

25,0

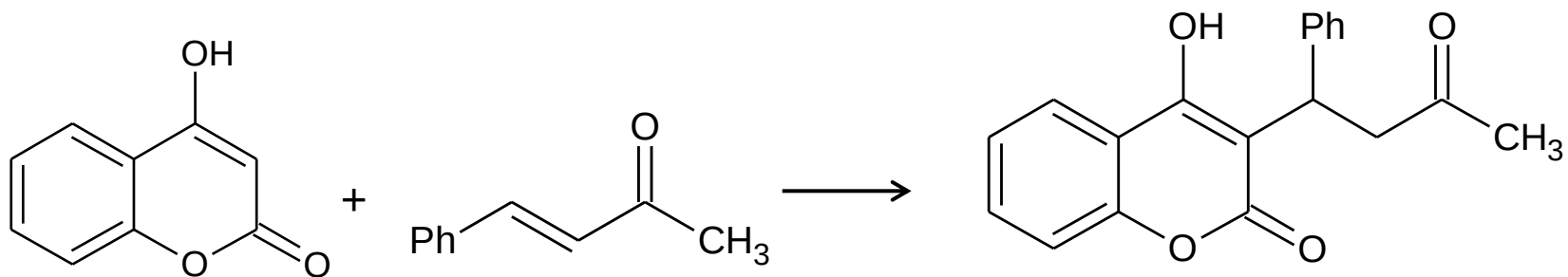
Липаза из *Candida rugosa*

52,0

He, T.; Li, K.; Wu, M.-Y.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Wang, H.-Y.; Li, C.; Yu, X.-Q.
Utilization of biocatalytic promiscuity for direct Mannich reaction // J. Mol. Cat.
B: Enz. – 2010. – V. 67, N 3-4. – P. 189-194

Реакция Михаэля

(присоединение нуклеофильного агента к α,β -ненасыщенному карбонильному соединению)



Гидроксикумарин + бензилиденацетон → варфарин

Xie B.-H., Guan Z., He Y.-H. Promiscuous enzyme-catalyzed Michael addition: synthesis of warfarin and derivatives// J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2012. – V. 87, N 12. – P. 1709-1714