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

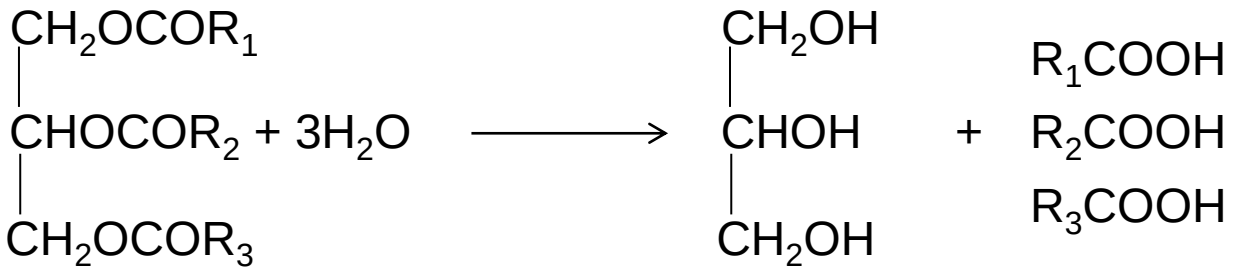
«В промышленном применении наиболее значимыми ферментами являются гидролазы (амилазы, протеиназы, липазы). Липазы применяются максимально широко ввиду их высокой каталитической активности, стабильности и способности катализировать большое количество самых разнообразных реакций»

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

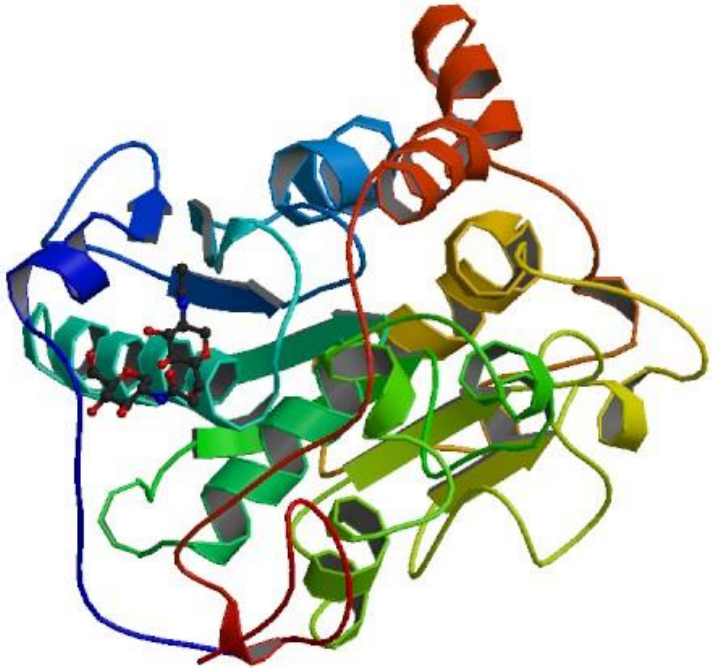
DiCosmo R., McAuliffe J., Poulose A.J., Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. - Chem. Soc. Rev., 2013, 42(15), 6434-6474

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



3D структура липазы В из *Candida antarctica*
(α,β-гидролазы – 8 β-листов и 6 α-спиралей)

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

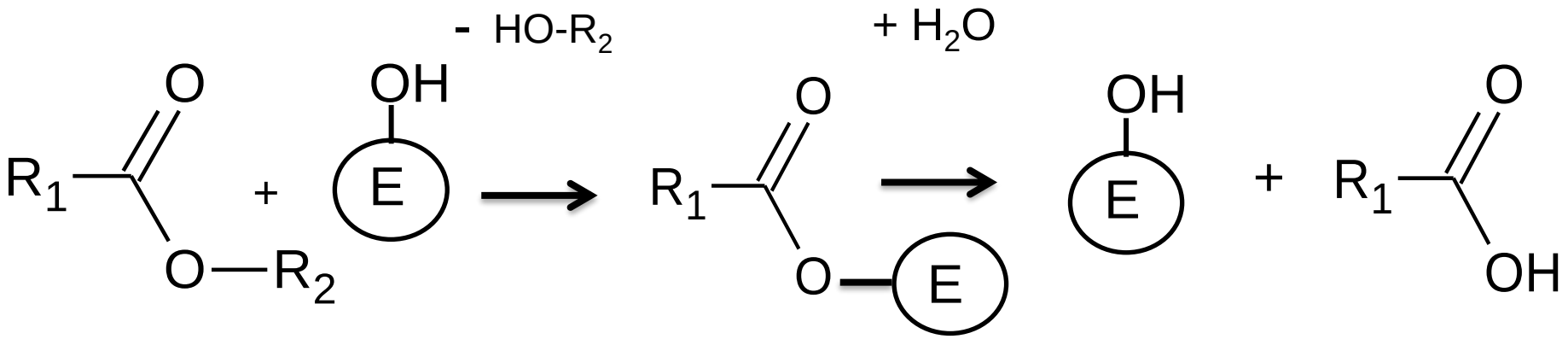
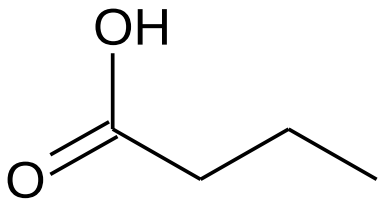


Схема ферментативного гидролиза сложноэфирной связи

Жирные кислоты – цепь не менее 4 атомов углерода

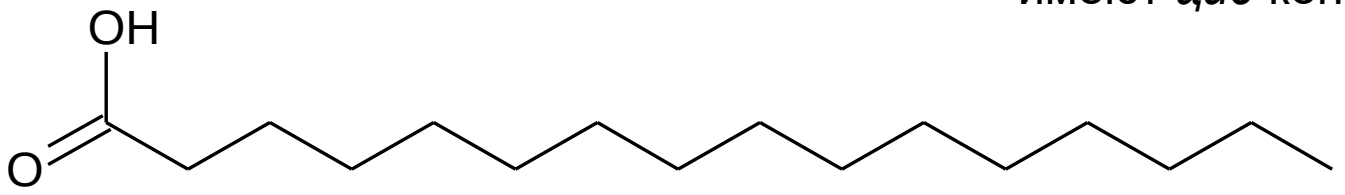


Масляная (С 4:0)

число атомов углерода четное

могут иметь одну или несколько двойных связей

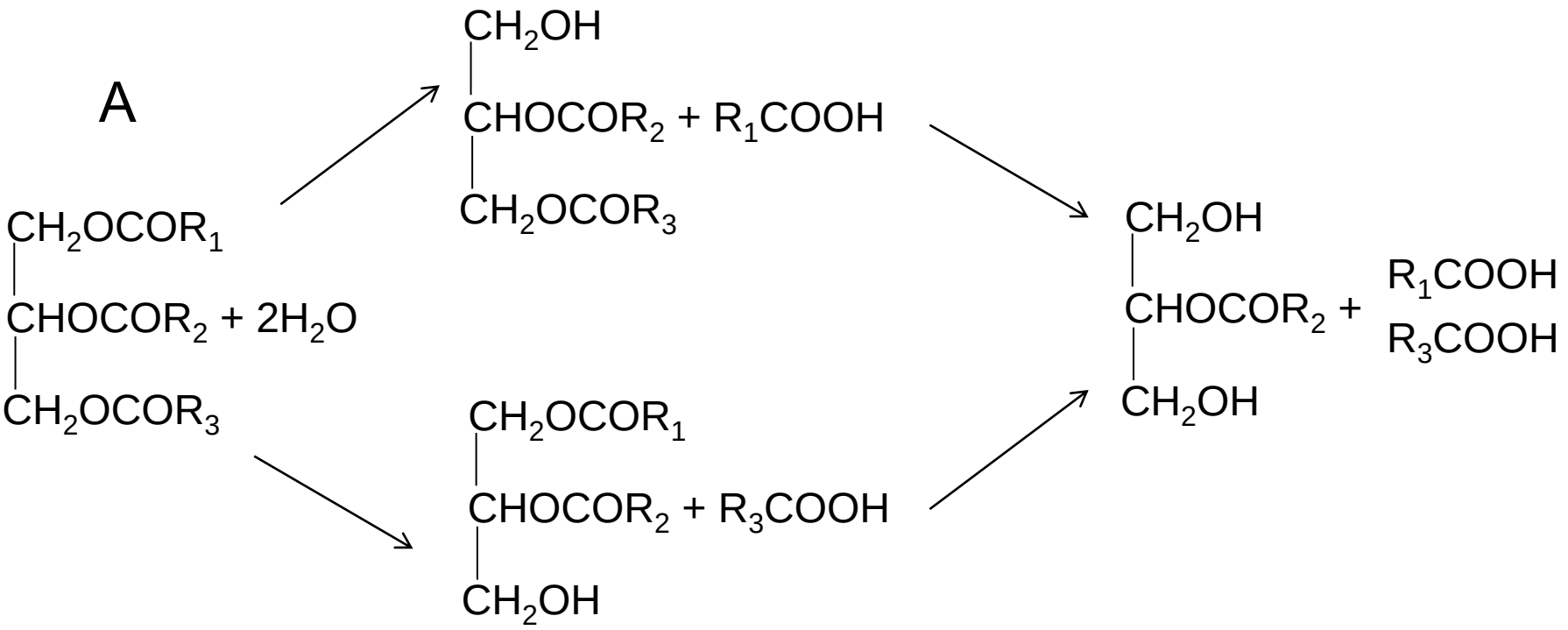
все двойные связи имеют *цис*-конфигурацию



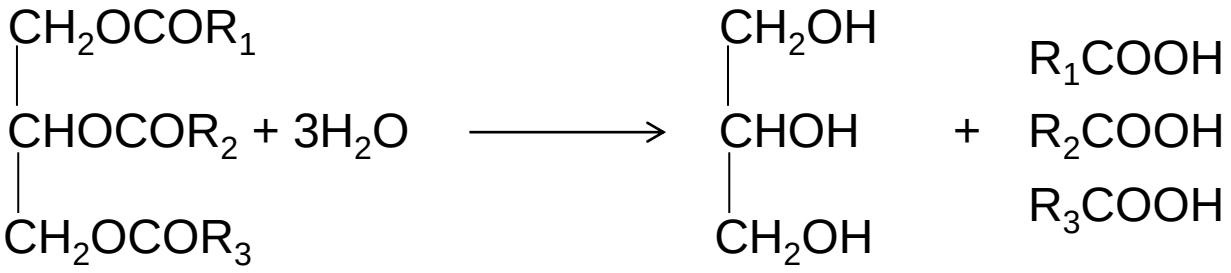
Пальмитиновая (С 16:0)

Миристиновая (С 14:0)
Стеариновая (С 18:0)
Олеиновая (С 18:1; 9)
Линолевая (С 18:2; 6, 9)
Линоленовая (С 18:3; 3, 6, 9)
Арахиновая (С 20:0)
Арахидоновая (С 20:4; 6, 9, 12, 15)

А



Б



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

Гидролиз жиров и масел

$$R_1COOR_2 + H_2O = R_1COOH + R_2OH$$

Пищеварительные ферментные средства

Ароматизация продуктов питания
(пищевая добавка Е1104)

Моноацилглицериды – эмульгаторы
(компонент пищевой добавки Е471)

Гидролиз жиров и масел

$$R_1COOR_2 + H_2O = R_1COOH + R_2OH$$

Стиральные порошки

Косметические средства ухода за кожей и волосами

Утилизация маслосодержащих отходов производства

(в 2001 году компания Novozyme за технологию обезжиривания хлопкового волокна получила премию Presidential Green Chemistry Challenge Award от EPA США)

Обезжиривание шкур

Обезжиривание бумажной пульпы

Реакции липаз в средах с низким содержанием воды
Этерификация $R_1COOH + R_2OH = R_1COOR_2 + H_2O$
Трансэтерификация – алкоголиз $R_1COOR_2 + R_3OH = R_1COOR_3 + R_2OH$
Трансэтерификация – ацидолиз $R_1COOR_2 + R_3COOH = R_3COOR_2 + R_1COOH$
Интерэтерификация $R_1COOR_2 + R_3COOR_4 = R_1COOR_4 + R_3COOR_1$
Аминолиз $R_1COOR_2 + R_3NH_2 \rightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$

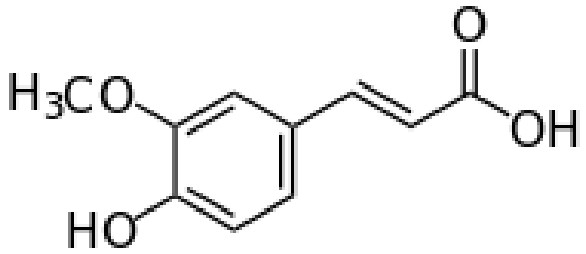
Этерификация

$$R_1COOH + R_2OH = R_1COOR_2 + H_2O$$

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

$$R_1COOH + R_2OH = R_1COOR_2 + H_2O$$

Пищевые эмульгаторы - 1,3-диацилглицериды –
(компонент пищевой добавки Е471) –
этерификация глицерина жирными кислотами

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

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

Этерификация

$$R_1COOH + R_2OH = R_1COOR_2 + H_2O$$

Увлажняющие эфиры для косметики (заменители минеральных или вазелинового масел)

Миристилмиристат
Децикокоат
Цетилрицинолеат
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

$$R_1COOR_2 + R_3OH = R_1COOR_3 + R_2OH$$

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

Диацилглицериды – глицеролиз растительных масел

Трансэтерификация – ацидолиз

$$R_1COOR_2 + R_3COOH = R_3COOR_2 + R_1COOH$$

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

$$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 = R_1COOR_4 + R_3COOR_1$$

Диацилглицериды – интерэтерификация рапсового масла моноацилглицеридами различного состава

Кулинарные масла – интерэтерификация рисового и пальмового масел

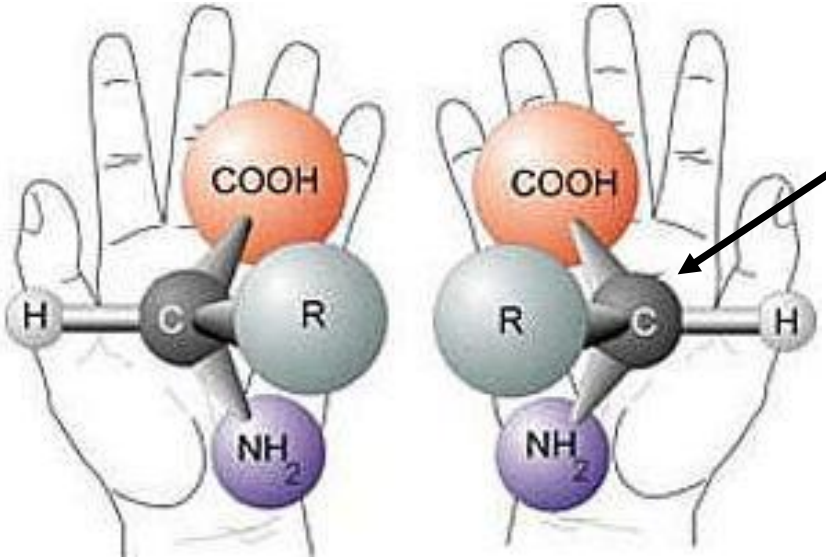
Искусственное масло какао – интерэтерификация пальмового масла тристеарином

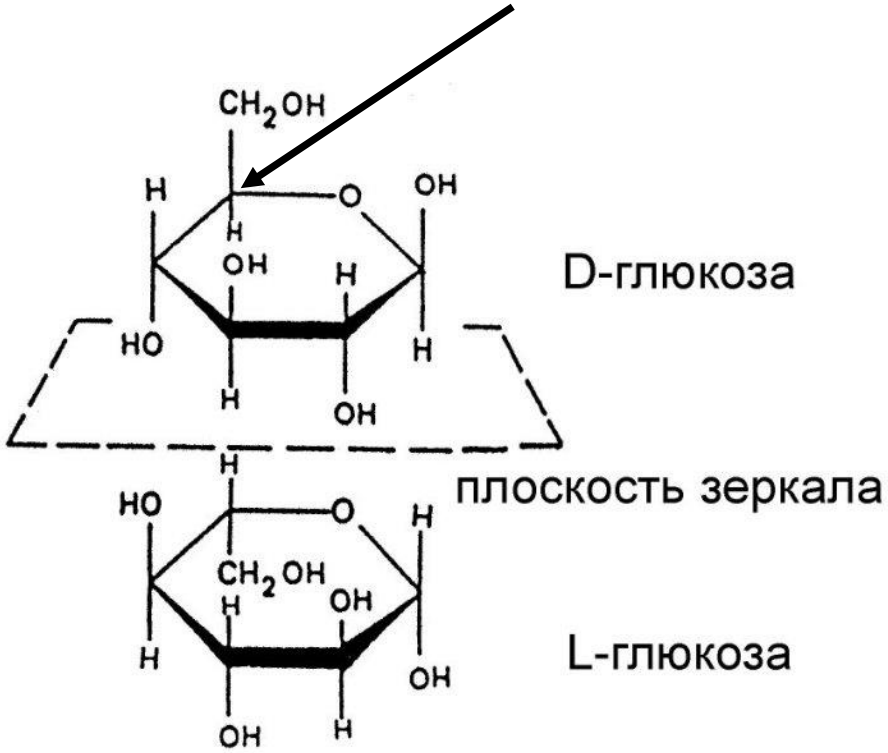
Аминолиз

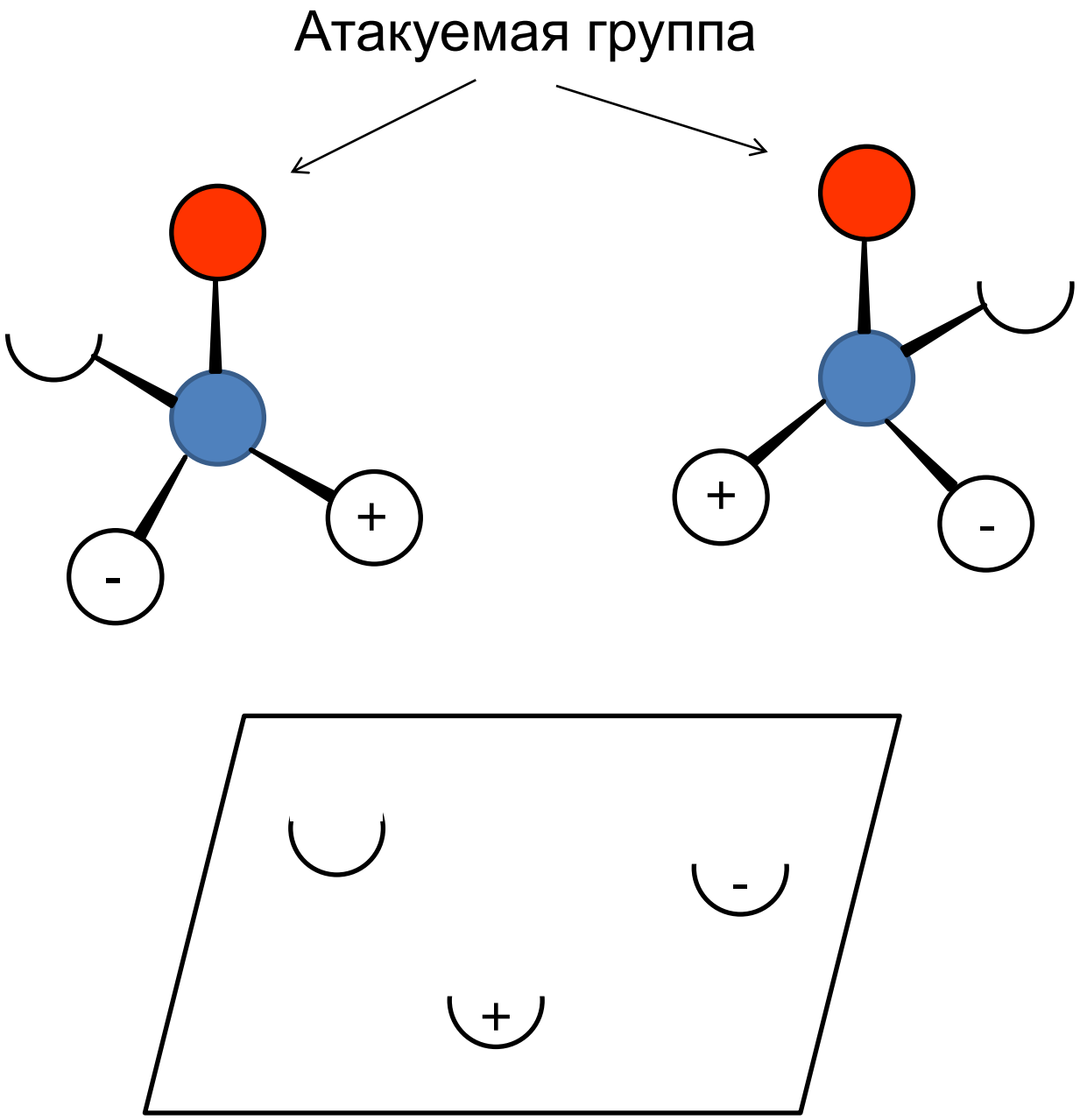
$R_1COOR_2 + R_3NH_2 \rightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$

N-ацилированные аминокислоты –
ПАВ для косметической промышленности

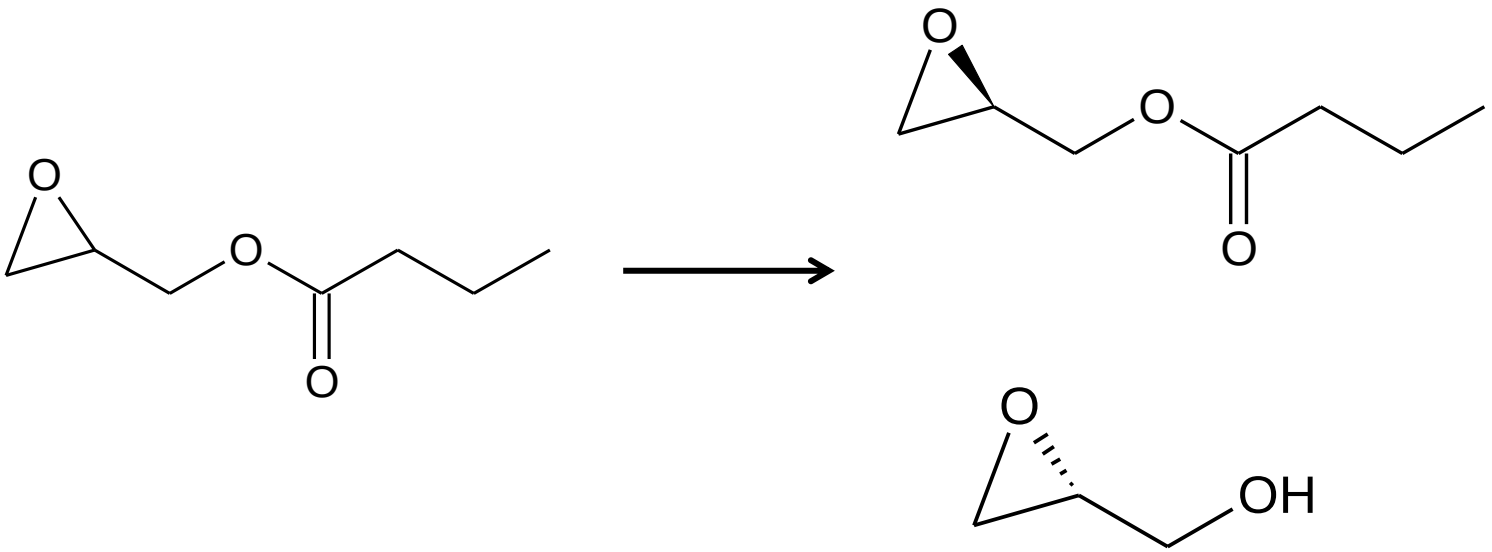
Хиральность






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)

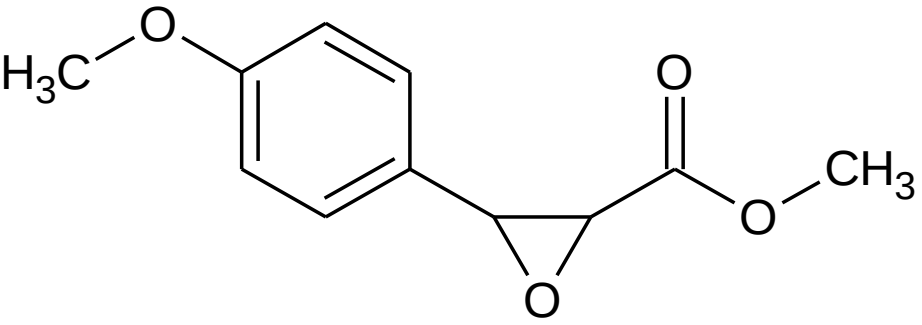


Выход (*R*)-энантиомера глицидола под действием свиной панкреатической липазы составляет 89% при оптической чистоте продукта *ee* 92%.

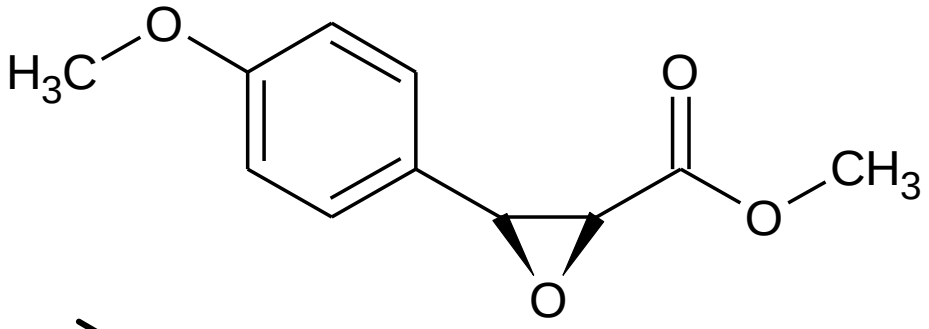
Компания Andeno-DSM использует этот процесс для крупнотоннажного получения (*R*)-глицидола (промежуточный продукт для синтеза β-адреноблокаторов).

Стереоселективный гидролиз метилового эфира
(±)-3-(4’-метоксифенил)глицидиловой кислоты

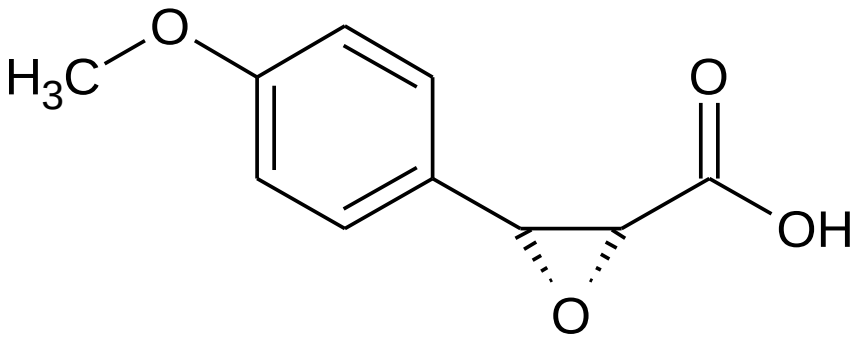
(B.Hu, J.Pan, H.-L.Yu, J.-W.Liu, J.-H.Xu. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto aminofuctionalyzed magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic sysnthesis of Diltiazem intermediate. – Proc. Biochem., 2009, 44 (9), 1019-1024)



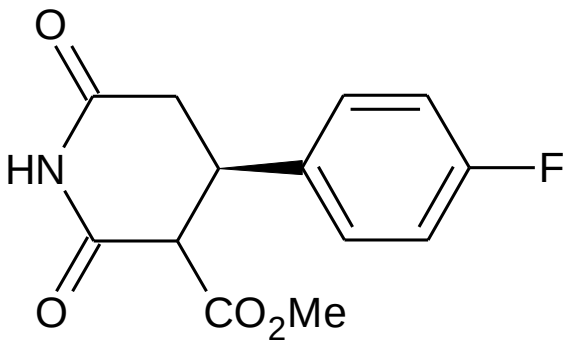
(±)-MPGM



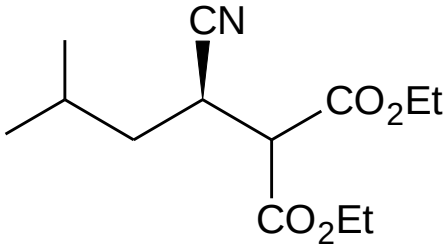
(-)-MPGM



(+)-MPG

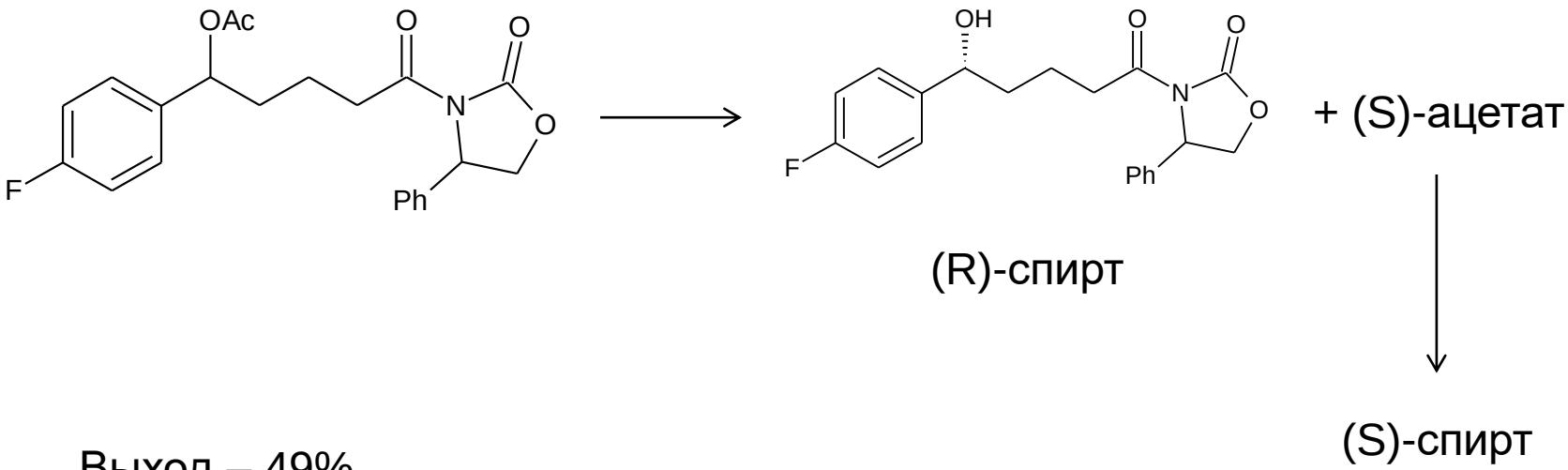


Полупродукт для получения пароксетина (антидепрессант).
Мощность производства – более 100 кг в год
(BioVerdant, WO/2009/005647)



Полупродукт для получения прегабалина (противоэпилептическое средство).
Мощность производства – более 100 тонн в год
(Pfizer, WO/2006/000904)

Повышение выхода полупродукта для получения эзетимиба
(ингибитор абсорбции холестерина в кишечнике)

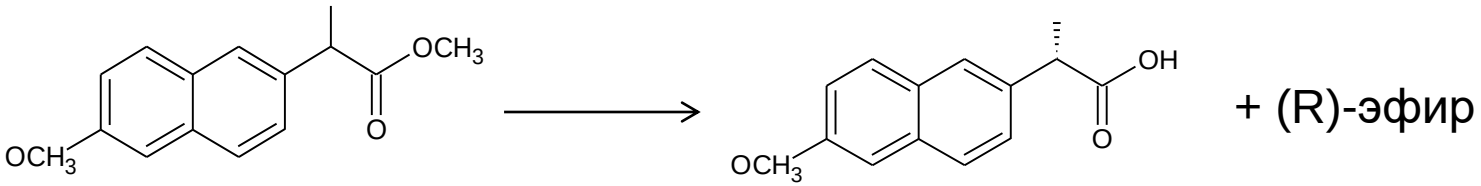


Выход – 49%

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 антивоспалительного препарата.
(S)-изомер в 28 раз активнее (R)-изомера



+ (R)-эфир

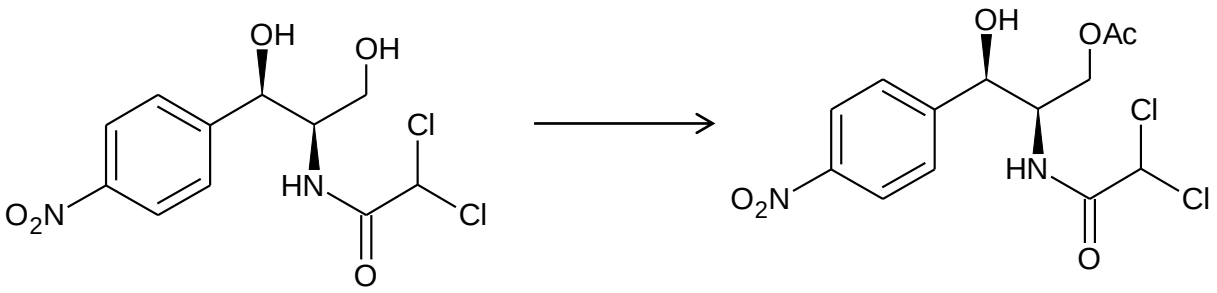
(S)-напроксен

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, снятие горькости)



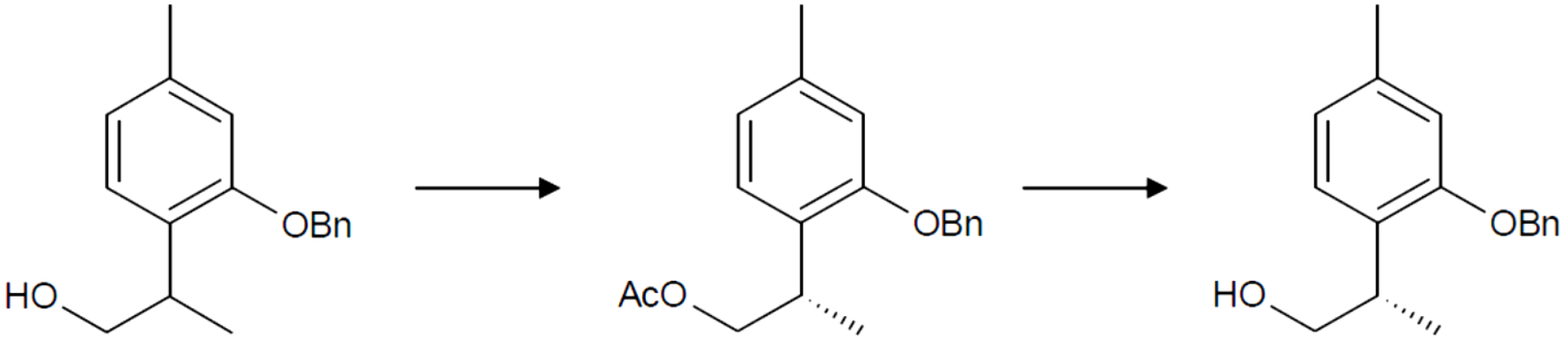
Выход – 94-98%

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
(замена 7-стадийного синтеза)

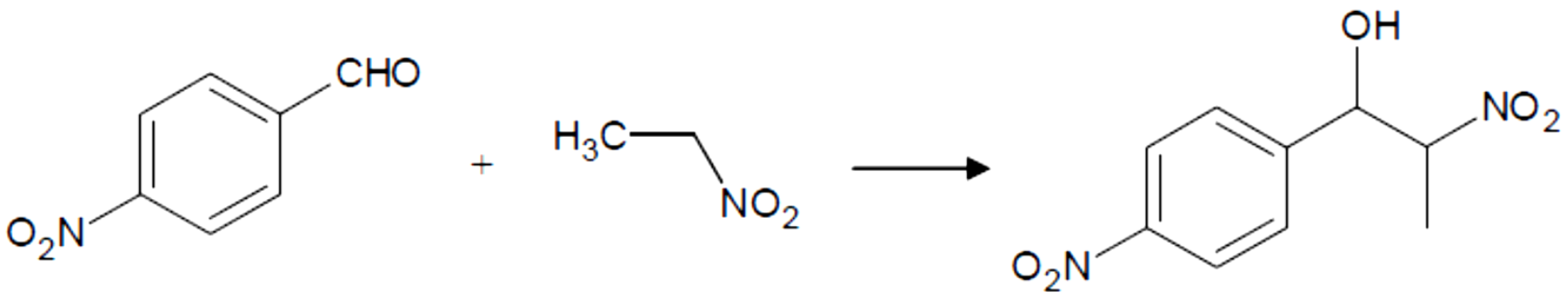


Оптическая чистота конечного S-изомера - 98%

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)

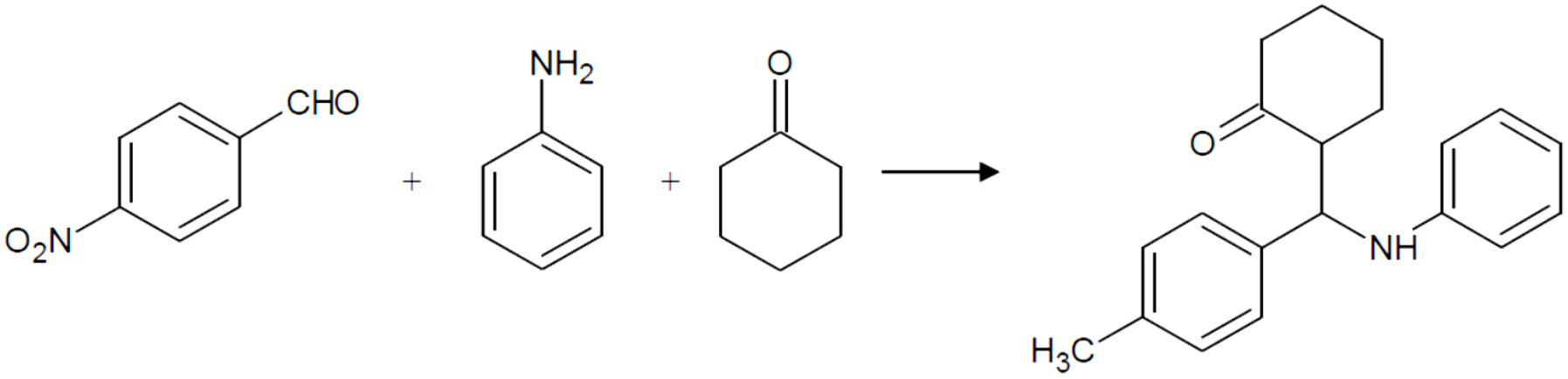


Фермент	Выход, %
-	Не определяется
Amano lipase M (липаза из *M.javanticus*)	75,0
Денатурированный фермент	Не определяется

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, 145 (3), 240-243

Реакция Манниха

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

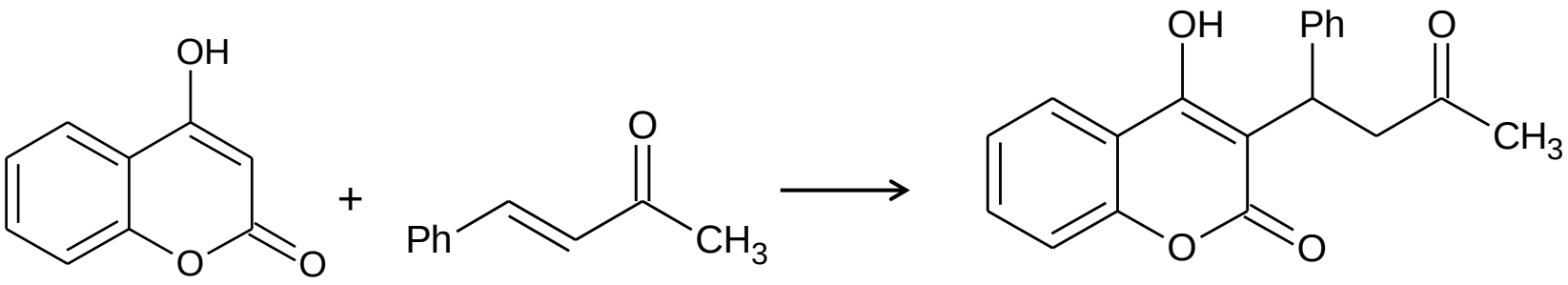


Фермент	Выход, %
-	Не определяется
Липаза из *Candida rugosa*	52,0
Денатурированный фермент	Не определяется

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, 67 (3-4), 189-194

Реакция Михаэля

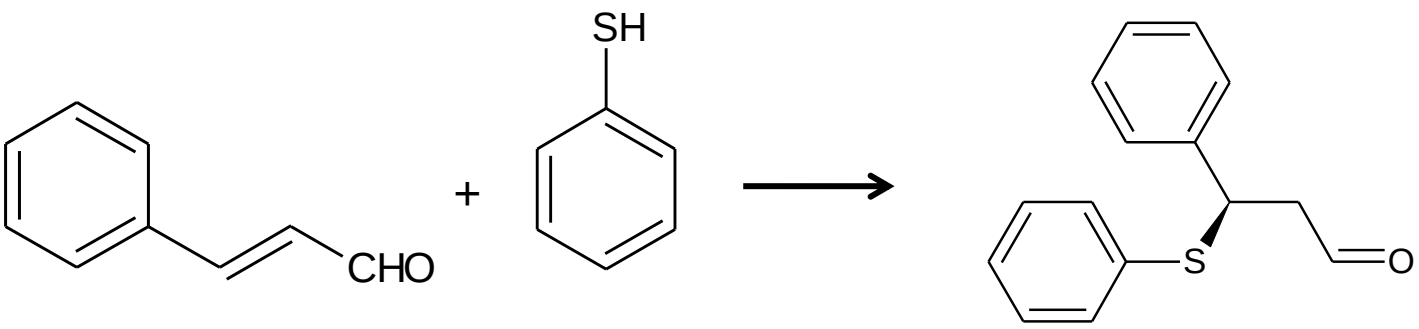
(присоединение нуклеофильного агента к α,β-ненасыщенному карбонильному соединению, свиная панкреатическая липаза)



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, 87 (12), 1709-1714

Тио-реакция Михаэля
(свиная панкреатическая липаза)



циннамальдегид тиофенол

Выход продукта 98%,
Оптическая чистота (*ee*) 97%

Rizzo P.V.S., Boarin L.A., Freitas I.O.M., Gomes R.S., Beatriz A., Rinaldi A.W., Domingues N.L. The study of biocatalyzed thio-Michael reaction: a greener and multi-gram protocol // Tetrahedron Lett. – 2014. – V. 55, N 2. – P. 430-434