

УДК 577.151; 579.66

А.В.СКЛЯРЕНКО<sup>1,\*</sup>, Н.В.МЕДВЕДЕВА<sup>1</sup>, А.И.СИДОРЕНКО<sup>1</sup>, ЙУН ХУАНГ<sup>2</sup>, ФУЛИ ЛИ<sup>3</sup>, С.В.ЯРОЦКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, 117545

<sup>2</sup> Qingdao Vland Biotech Inc., Китай

<sup>3</sup> Институт биоэнергетики и технологии биопроцессов, Китайская Акад. наук, Китай

e-mail: asklyarenko@yandex.ru

## Технологические биокатализаторы на основе липазы *Candida antarctica* и их применение

Обзор посвящен проблеме создания и практического применения технологических биокатализаторов на основе липазы фракции В из дрожжей *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CALB). Уникальность данного фермента, обеспечивающая широчайшие возможности его практического использования, определяется его промежуточным положением между эстеразами и истинными межфазно активируемыми липазами. Проявляя широкую субстратную специфичность в отношении синтеза-гидролиза многочисленных эфиров, амидов и тиолов, присущую эстеразам, CALB обладает способностью липаз функционировать на границе раздела фаз эмульгированных субстратов и в среде органических растворителей, демонстрируя при этом высокую термостабильность, толерантность к присутствию как полярных, так и неполярных растворителей, а также стерео- и позиционную селективность. Известные подходы к иммобилизации CALB обсуждены с точки зрения строения и свойств фермента, а также целевого назначения получаемого биокатализатора. Обобщены имеющиеся в литературе сведения о возможностях практического использования биокатализаторов на основе CALB.

*Ключевые слова:* биокатализаторы, иммобилизация, липаза В *Candida antarctica*, CALB.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-3-10-56

Липазы (КФ 3.1.1.3) представляют собой класс гидролаз, которые расщепляют сложноэфирную связь в триглицеридах на границе раздела фаз вода—масло. Липаза фракции В из дрожжей *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CALB) является ферментом, чрезвычайно широко востребованным для создания дружественных окружающей среде технологических процессов «зеленой химии» бла-

годаря особенностям своего строения и промежуточному положению между эстеразами и истинными межфазно активируемыми липазами. Использование CALB для осуществления биокаталитических процессов взамен химических трансформаций определяется широкой субстратной специфичностью данного фермента, его высокой стерео- и позиционной селективностью, а также спо-

Скляренко Анна Владимировна, Медведева Наталья Викторовна, Сидоренко Анна Игоревна, Йун Хуанг, Фули Ли, Яроцкий Сергей Викторович.

*Список сокращений:* БК — биокатализатор; ГА — глутаральдегид; [BMIm][dca] — 1-бутил-3-имидазолий дигидрофосфат; BSA — бычий сывороточный альбумин; CALB — липаза В *Candida antarctica*; CLECs — поперечно сшитые ферментные кристаллы; CLEs — аморфный осадок сшитого фермента; CLEAs — поперечно сшитые ферментные агрегаты; PEG — полиэтиленгликоль; scCO<sub>2</sub> — суперкритический диоксид углерода; SDS — додецилсульфат натрия.

\* Автор для переписки.

способностью работать в гетерогенных системах (на границе раздела фаз) и в органических растворителях при малом содержании воды, осуществляя процессы гидролиза, аминолитиза, этерификации и переэтерификации разнообразных низкомолекулярных и высокомолекулярных субстратов.

Ключевым фактором практического применения фермента является возможность его использования в форме гетерогенного технологического биокатализатора (БК), что обеспечивает повышение стабильности фермента, возможность его многократного применения, а также отсутствие белкового загрязнения реакционной смеси. Стратегия создания технологических биокатализаторов на основе CALB имеет свои особенности, связанные со структурой и каталитическими свойствами этого фермента.

Помимо большого прикладного значения CALB представляет научный интерес в качестве прекрасного объекта для конформационной инженерии — варьирования свойств биокатализатора (активности, стабильности, селективности) путем направленного воздействия на конформацию белка при использовании различных методик иммобилизации.

### ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА CALB

Изучение CALB началось с конца 1980-х годов после того, как из дрожжей *Candida antarctica*, обнаруженных в водах вечно покрытого льдом озера Ванда в Антарктиде, были выделены два фермента (фракции А и В), обладающие липолитической активностью [1—3]. Липаза фракции В с молекулярной массой 33 кДа и  $pI = 6,0—6,8$  (по разным данным) [4—7] привлекла внимание исследователей благодаря своей высокой энантиоселективности в процессах гидролиза и органического синтеза, причем как в водной, так и в неводной средах [6, 8—13]. Кроме того, CALB весьма стабильна. В водной среде фермент сохраняет исходную конформацию в диапазоне pH 3,5—9,5, а температура его денатурации составляет 50—60° в зависимости от pH [11]. После инкубации в течение 5 мин при 100° в водной среде CALB сохраняет около 50% активности [14]. В неводных средах термостабильность CALB значительно возрастает, что позволяет многократно использовать фермент при высоких температурах (60—120°) в органических растворителях [14, 15], ионных жидкостях [16—19] и суперкритической двуокиси углерода [17] (жидкости в суперкритическом состоянии используются в технологии в качестве заменителей органических растворителей), а также в сме-

си с твердым полимером (сукцинатом полибутилена) в экструдере в среде дихлорэтана [14] или при гетерогенном катализе газофазных процессов [20]. Так, CALB успешно функционирует как в неполярных (например, гексан, изооктан), так и в полярных (например, ацетон, ацетонитрил, диоксан) органических растворителях [6, 11, 12, 15, 21—24]. Об активности CALB в ионных жидкостях свидетельствуют работы [16—18, 25, 26]; в суперкритической двуокиси углерода — исследования [17, 27, 28]. Положение термодинамического равновесия ферментативной реакции синтеза-гидролиза, протекающей в среде органического растворителя, определяется наличием остаточной воды в реакционной среде. Способность CALB сохранять активность при чрезвычайно низком содержании воды обеспечивает достижение высокого выхода продуктов синтетических реакций [11, 21, 22, 29].

### СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ CALB

Исследования структуры молекулы CALB, состава и строения ее активного центра позволили раскрыть механизмы межфазной активации фермента, его каталитического действия, а также энантио- и позиционной селективности [4, 13, 30—33].

Полипептидная цепь CALB состоит из 317 аминокислот и имеет характерную для гидролаз  $\alpha/\beta$ -фолдинговую структуру [4, 13]. Кристаллографические исследования CALB [4, 30] показали, что белковая глобула фермента — это эллипсоид размером 30×40×50 Å. При этом активный центр фермента представляет собой узкий «карман» размером примерно 10×4 Å при большой глубине — 12 Å.

CALB, как и другие липазы, относится к классу сериновых протеаз, характерной чертой которых является наличие в каталитическом домене трех аминокислот классической каталитической триады Ser-His-Asp, играющих роль нуклеофила, кислоты и основания, соответственно [13, 34—38]. В CALB каталитическая триада располагается у С-концевого участка молекулы и состоит из Ser105, Asp187 и His224 [4, 30]. Активный центр CALB включает также образованный несколькими гидрофобными аминокислотными остатками стереоспецифический карман, обеспечивающий связывание субстрата с ферментом, и оксианионную полость (Thr40 и Gln106), стабилизирующую переходные состояния (тетраэдральные комплексы) при каталитическом акте [4, 11, 31—34]. Стереоспецифический карман CALB состоит из двух каналов, больший из которых ответственен за связыва-

ние ацильной части субстрата, а меньший — спиртовой. В соответствии с физическими размерами связывающих доменов CALB проявляет относительно широкую специфичность в отношении ацильных доноров и высокую хемо- и стереоселективность в отношении строения спиртовой части субстрата [11, 13, 21, 39].

Механизм действия CALB аналогичен механизму действия других сериновых протеаз [4, 30, 40]. Каталитический акт протекает через образование ацил-ферментного комплекса и двух тетраэдральных промежуточных соединений. Нуклеофильная атака гидроксильной группы Ser105 на углеродный атом эфирной связи субстрата приводит к образованию первого тетраэдрального промежуточного соединения, превращающегося в ацил-ферментный комплекс после отщепления спирта. В результате нуклеофильной атаки воды на ацил-ферментный комплекс образуется второе тетраэдральное промежуточное соединение, распадающееся затем с образованием кислоты и свободного фермента. Изучение кинетики действия липаз, в частности CALB, в форме гетерогенного биокатализатора, осуществлено в ряде исследований [41, 42].

Важной особенностью большинства липаз является наличие мобильной складчатой амфифильной олигопептидной структуры (так называемой «крышки»), экранирующей доступ к активному центру. Ее положение определяет реализацию открытой (активной) и закрытой (неактивной) формы фермента [13, 37, 43—48], т.е. обеспечивает межфазную активацию фермента при его контакте с гидрофобной поверхностью за счет структурных изменений в белковой глобуле. Методами направленного мутагенеза была показана роль олигопептидной крышки в активности, специфичности и конформационной стабильности липаз [47, 49]. Крышка в молекуле CALB образована петлей короткой подвижной  $\alpha$ -спирали ( $\alpha$ -5) от Thr142 до Ala46, в которой гидрофобная часть направлена в сторону активного центра, а гидрофильная наружу, причем сама крышка невелика и не полностью закрывает активный центр [3, 6, 49—51]. Вследствие этого фермент обладает способностью адсорбироваться и функционировать на поверхности раздела фаз, однако эффект поверхностной активации у него выражен слабо или не наблюдается вовсе [11, 37, 52, 53]. В отличие от других липаз CALB не обладает способностью образовывать молекулярные димеры даже при высокой концентрации белка в водном растворе в отсутствие детергентов [54] и легко, с незначительными конформационными изменениями, прини-

мает открытую форму [50, 51], что определяет ее уникальную субстратную специфичность и способность осуществлять реакции в водной среде и в полярных растворителях.

Конформационные изменения молекулы CALB в поверхностном монослое микроэмульсии, сопровождающиеся увеличением активности фермента, недавно продемонстрированы в работе [55].

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ CALB

CALB гидролизует триглицериды и этерифицирует глицерин, демонстрируя при этом 1,3-региоселективность [5, 53]. Однако по сравнению с другими липазами она менее эффективна при гидролизе триглицеридов, особенно имеющих длинные жирнокислотные остатки. CALB проявляет эстеразную активность, осуществляя реакции этерификации и переэтерификации одноатомных и двухатомных спиртов, аминов, аминокислот, реакции гидролиза соответствующих эфиров, а также синтеза-гидролиза амидов и тиолов [11, 39, 40]. Относительно низкая активность CALB при гидролизе триглицеридов с длинными жирнокислотными остатками и ее способность легко принимать открытую конформацию благодаря малым размерам олигопептидной крышки позволяют отнести CALB к ферментам, занимающим промежуточное положение между эстеразами и истинными межфазно активируемыми липазами [4, 11, 30].

Субстратная специфичность CALB, включая энантио-, хемо- и региоселективность, а также влияние на ее селективность состава среды и температуры постоянно изучаются и обобщаются, открывая все более широкие возможности для практического использования фермента [6, 11, 18, 39, 40, 52, 56—63]. Эффективным инструментом исследования субстратной специфичности CALB являются методы молекулярного моделирования, основанные на данных о кристаллографической структуре белка. Полученные при этом результаты находят экспериментальное подтверждение при изучении различных трансформаций, осуществляемых CALB, и позволяют создавать мутантные формы с заданными свойствами методами рационального дизайна [32, 34, 37, 60].

Высокая энантиоселективность CALB была предсказана на основании структурного моделирования промежуточных тетраэдральных комплексов, показавшего, что только R-энантиомеры эфирных субстратов связываются с группами гидрофобного домена фермента в пространственной ориентации, пригодной для дальнейшего протека-

ния каталитического акта [4, 11, 39]. С термодинамической точки зрения энантиоселективность CALB базируется на различии значений свободной энергии активации R- и S-изомеров в ферментативном процессе [13, 31, 34, 56, 64]. Многочисленные экспериментальные и модельные исследования подтвердили высокую R-селективность CALB [13, 21, 31—33, 39], а также позволили методами направленного мутагенеза создать S-селективный мутант [31]. Методом рационального дизайна энантиоселективность CALB в процессе кинетического разделения 1-хлор-2-октанола была повышена вдвое путем точечной мутации Ser47Ala [64].

O/N-позиционная селективность CALB изучена на примере ацилирования аминокислот мистриновой кислотой [65, 66]. Показано, что она определяется длиной цепи ацильного донора, наличием нуклеофила в  $\beta$ -позиции к аминогруппе, а также свойствами органического растворителя, используемого в качестве реакционной среды. Позиционная O-селективность и R-энантиоселективность CALB в реакции ацилирования аминокислоты S/R-пропанола винилацетатом установлена экспериментально и подтверждена моделированием ацил-ферментных комплексов [32, 33]. Изучение хемо- и региоселективности CALB при ацилировании лизинсодержащих пептидов олеиновой кислотой показало прекрасное совпадение теоретических предсказаний, сделанных на основании молекулярного моделирования ацил-ферментных комплексов, и экспериментальных данных о предпочтительном N $\epsilon$ -ацилировании остатков лизина [67].

Основополагающая роль вторичной структуры молекулы CALB, которая определяется используемым органическим растворителем, для региоселективности фермента при синтезе моно- и диэфиров была продемонстрирована на примере этерификации фруктозы лауриновой кислотой [23].

Ген CALB был клонирован и экспрессирован в различных системах, таких как *Aspergillus oryzae* [18, 68], *Saccharomyces cerevisiae* [69], *Escherichia coli* [70, 71], *Yarrowia lipolytica* [72], *Pichia pastoris* [73—75]. Результаты, обеспечивающие уровень продукции целевого фермента, пригодный для промышленного использования (3—5 г/л), достигнуты в последнее время с использованием *Pichia pastoris* [76, 77]. Методами направленного мутагенеза созданы штаммы, продуцирующие мутанты CALB с расширенной специфичностью или повышенной селективностью [31, 34, 49, 64, 78—81]. Например, замена Ser105, входящего в каталитическую триаду CALB, на Ala позволила получить мутант гидролитического фермента, способный к синтезу C—C-связей с помощью реак-

ции альдольной конденсации [79, 80]. С использованием методов компьютерного моделирования созданы мутанты CALB, обладающие повышенной стабильностью в гидрофильных органических растворителях [82] или увеличенной термостабильностью [83].

## МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Создание биокаталитической технологии, конкурентоспособной по сравнению с химическими методами синтеза, возможно только при применении гетерогенных биокатализаторов, получаемых путем иммобилизации необходимых ферментов [84—87]. Основными методами, используемыми для получения технологических биокатализаторов, являются следующие: адсорбция фермента на носителе; включение фермента в гелевые матрицы или полимерные оболочки; ковалентное связывание фермента с носителем (одноточечное или многоточечное); поперечная сшивка молекул, кристаллов или физических агрегатов фермента (иммобилизация без носителя). Недостатки физических методов иммобилизации (адсорбция или включение), такие как обратимость связывания и низкая стабильность продукта, могут быть устранены путем ковалентной сшивки адсорбированного или включенного в матрицу фермента [85, 88—93].

Выбор наилучшего для данного фермента метода иммобилизации и его оптимизация, учитывающая как структуру и свойства белка, так и специфику целевой трансформации, позволяют достичь высокой производительности разрабатываемой биокаталитической технологии (см., например, [94—97]). Более того, иммобилизация фермента является способом варьирования его специфичности путем фиксации определенных конформационных изменений белковой глобулы [98—101]. Природная способность CALB и других липаз функционировать на поверхности раздела фаз, а также хорошая изученность изменений в их структуре при каталитическом акте и варьировании состава среды делает эти ферменты удобными объектами для конформационной инженерии [50, 51, 98, 101—105].

Иммобилизационная фиксация липаз, в частности CALB, в открытой активной форме, на которую направлены усилия исследователей [84, 85], может быть достигнута различными обсуждаемыми ниже приемами. С точки зрения разработки методов иммобилизации CALB существенны такие особенности структуры данного фермента, как высокая степень гидрофобности его поверхности [51], локализация гидрофобных и гидрофиль-

ных остатков в виде больших отдельных поверхностных зон [85, 106], а также расположение большей части доступных остатков лизина в гидрофильных зонах поверхности белковой глобулы вдали от активного центра фермента [30, 94, 96, 106], 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 [6, 49, 51, 85], обеспечивающий структурные изменения белковой глобулы, существенные для катализа и стабильности фермента, которые могут быть зафиксированы в результате иммобилизации.

При создании технологических БК предпочтительным является использование мезо-, макро- или гигапористых носителей [107], так как для эффективного заполнения ферментом внутренней поверхности матрицы размер пор должен быть по крайней мере в 4—5 раз больше, чем размер иммобилизуемого белка [108—111], т.е. в случае CALB около 25 нм. Однако из-за наличия диффузионных ограничений в ходе биокаталитических трансформаций только при размере пор около 100 нм (макропоры) каталитическая активность БК перестает зависеть от данного параметра [109, 112]. На выход, активность и стабильность иммобилизованного фермента влияют также размер внутренней поверхности носителя и размер частиц [85, 113, 114]. В случае CALB решающее значение имеет природа поверхности носителя, что будет продемонстрировано ниже на конкретных примерах.

Важную роль играет механическая прочность носителя и его устойчивость к химическим, температурным и иным стрессам, так как эти факторы решающим образом влияют на операционную стабильность БК и в конечном итоге на экономическую эффективность биокаталитической технологии в целом [114, 115]. Отметим, что такая эффективность (получения БК и его эксплуатации) является важным критерием при осуществлении комплексной оптимизации процессов иммобилизации CALB и целевой биокаталитической трансформации [95, 113].

Основные имеющиеся в литературе данные по получению гетерогенных БК путем иммобилизации CALB обобщены в таблице. Следует сказать, что сопоставление результатов, полученных в различных работах, сильно затруднено из-за различия используемых методов определения ферментативной активности, условий тестирования стабильности полученного препарата и оценки эффективности процесса иммобилизации (собственно выход

иммобилизованного фермента или соотношение активности связанного и свободного белка).

#### **ИММОБИЛИЗАЦИЯ CALB С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ФИЗИЧЕСКОЙ АДСОРБЦИИ**

Для адсорбционной иммобилизации ферментов используют разнообразные неорганические носители или синтетические полимеры, предпочтительно с развитой поверхностью [85, 87, 90]. Адсорбционное связывание фермента достигается за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, а также электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка [131, 132]. Неоспоримыми преимуществами адсорбционной иммобилизации являются доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей, а также простота применяемых методик. Однако обратимость адсорбционного связывания ферментов, часто наблюдаемая в условиях проведения целевой биотрансформации, ограничивает применение данного метода иммобилизации, так как может приводить к снижению активности биокатализатора, а также к загрязнению продукта. Методические подходы к преодолению этого недостатка обсуждаются ниже.

Учитывая естественную способность липаз к адсорбции на поверхности раздела фаз за счет гидрофобных взаимодействий, для адсорбционной иммобилизации CALB используют пористые носители, обладающие высокоразвитой гидрофобной поверхностью [85]. Это позволяет получить гетерогенный БК, в котором липаза находится в открытой активной форме и, как правило, обладает высокой стабильностью к неблагоприятным воздействиям (см. таблицу, № 1—5). Для целей адсорбционно-гидрофобной иммобилизации CALB пригодны такие синтетические полимеры, как полистирол, полипропилен, сополимеры стирола или акрилата с дивинилбензолом [19, 51, 95, 113—115, 117—120, 124, 133—135] или слабо гидрофобные полимеры на основе метакрилата [101, 113, 116, 119]. С целью повышения гидрофобности слабо гидрофобных или гидрофильных поверхностей их модифицируют путем прививки алкильных и/или ароматических остатков. Этот подход использован при получении CALB, иммобилизованной на гидрофильных силикагелях, модифицированных различными способами [15, 101, 108, 109, 122, 136], октилагарозе [137—139] и производных полиметакрилата (от бутил- до октадецил-) [117, 139], в частности, на октадецил-Sepabeads® [116, 133, 140—142].

При гидрофобной адсорбции CALB лучшие результаты по уровню и выходу активности БК достигнуты с использованием дивинилбензол/акрилатного носителя ECR1030 (Purolite®), обладающего высокой гидрофобностью и прекрасными механическими свойствами [114].

Чаще всего адсорбцию CALB на носителе осуществляют в водной среде. Однако было показано [118], что использование гидрофобного растворителя изооктана в качестве среды для адсорбции CALB и макропористого носителя на основе гидрофилизованного полистирола (в присутствии небольшого объема водного раствора фермента) существенно увеличивает выход иммобилизации. Причиной этого феномена, вероятно, является концентрирование CALB в тонком приповерхностном водном слое, что позволяет получить БК, обладающий высокой термической и рН-стабильностью (см. таблицу, № 6).

Увеличение эффективности действия иммобилизованной CALB при повышении гидрофобности использованного носителя в процессах этерификации и трансэтерификации в неводных средах, в том числе при разделении рацематов, продемонстрировано в ряде работ [117, 135] (см. таблицу, № 5). Сравнительные исследования эффективности CALB, иммобилизованной на различных полимерных макропористых носителях за счет адсорбционного связывания (см. таблицу, № 7), в реакции полимеризации лактонов [119] показали преимущество адсорбционной иммобилизации фермента с использованием гидрофобных носителей на основе полипропилена по сравнению с акрилатными, полистирольными и полисилоксановыми адсорбентами.

Показано, что в процессе энантиоселективного гидролиза диэтилового эфира 3-фенилглутаровой кислоты CALB, иммобилизованная путем адсорбции на октил-агарозе, обладает в 20 раз более высокой селективностью, чем фермент, адсорбированный на Butyl-Toyorearl (гидрофобизованном акрилатном носителе, структурированном в виде очень тонких нитей, по толщине сравнимых с размером белковой глобулы) [139]. По мнению авторов, наблюдаемый эффект связан, вероятно, с различиями в конформационных изменениях фермента, происходящих при его адсорбции на гидрофобизованной поверхности агарозы, практически плоской в сравнении с размерами белка, и на тонких нитях гидрофобизованного акрилатного носителя. При гидролитическом разделении рацематов, протекающем в водной или водно-органической среде, CALB, иммобилизованная адсорбцией на гидрофобном носителе октадецил-Sepabe-

ads®), оказалась малоэффективной [140]. Можно заключить, что гидрофобная адсорбция способна оказывать влияние на степень энантиоселективности CALB, однако закономерности этого влияния пока не изучены.

Прочное адсорбционное связывание CALB с высоко гидрофобным носителем увеличивает термическую и операционную стабильность фермента, а также его устойчивость к органическим растворителям (см. таблицу, № 6, 8—10) [15, 101, 108, 118, 120]. Показано, что повышение гидрофобности поверхности метакрилатного носителя путем прививки октадецильных остатков (носитель октадецил-Sepabeads®) позволяет получить иммобилизованную CALB, более толерантную к присутствию перекиси водорода, чем препарат Novozym® 435 (CALB, адсорбированная на метакрилатном носителе) [141]. CALB, адсорбционно иммобилизованная на высоко гидрофобном стирол-дивинилбензоле, в 100 раз более стабильна в 10 М перекиси водорода, чем Novozym® 435 [120] (см. таблицу, № 10).

Помимо адсорбционно-гидрофобной описана адсорбционно-ионная иммобилизация CALB, осуществляемая за счет связывания заряженных участков белковой глобулы с покрытыми полиэтиленмином носителями [98, 101, 103, 104] (см. таблицу № 2—4). Различие в ориентации молекулы CALB при ионной иммобилизации и гидрофобной иммобилизации обуславливает различные субстратную специфичность и энантиоселективность получаемых БК в реакциях гидролиза короткоцепочечных сложных эфиров ароматических кислот [101].

Использование адсорбционного связывания с гидрофобным носителем позволяет решить также проблему очистки липазы (в том числе CALB), так как в отличие от большинства белков адсорбция липаз не требует высокой ионной силы раствора и осуществляется за счет взаимодействия обширных гидрофобных участков на поверхности фермента и носителя [54, 101, 116, 137—139, 143].

Оптимальный тип носителя для адсорбции фермента зависит от природы и условий протекания целевых биокаталитических процессов. Если гидролиз и синтез осуществляются в водной среде, наиболее подходящими оказываются БК, получаемые путем адсорбции CALB на гидрофильных носителях на основе двуокиси кремния, например, природных силикатах, силикагелях и мезопористых материалах упорядоченной структуры [85, 122, 144]. В этом случае связывание фермента с носителем осуществляется за счет электростатических взаимодействий гидрофильных групп белка и образования водородных связей.

## Свойства биокатализаторов на основе иммобилизованной CALB

Сокращения в таблице: ГА — глутаровый альдегид; Ед — единица липазной (гидролазной или синтетазной) активности; КЛ — капролактон; ОМ — оливковое масло; ПКЛ — поликапролактон; ПЛ — пропиллаурат; п-НФБ — п-нитрофенилбутират; буфер; ЭБ — этилбутират; BSA — бычий сывороточный альбумин; CLEAs — поперечно сшитые ферментные агрегаты; ее (%) — ETMS — этилтриметоксисилан; MTMS — метилтриметоксисилан; Novozym® 435 — CALB, иммобилизованная на носителе раметоксисилан.

№	Получение биокатализатора Obtaining of biocatalyst			Свойства биокатализатора Characteristics of biocatalyst
	Носитель для иммобилизации Carrier for immobilization	Способ иммобилизации Method for immobilization	Выход активности, % Activity yield, %	Активность БК, Ед/г Activity of biocatalyst, U/g
1	2	3	4	5
1	Octadecyl-Sepabeads (полиметакрилат) (polymetacrylate)	Адсорбция Adsorption	—	0,95 (гидролиз п-НФП, 25°, pH 7,0) 0.95 (hydrolysis of p-NPP, 25°C, pH 7.0) 2 (гидролиз ЭБ, 25°, pH 7,0) 2 (hydrolysis of ethyl butyrate, 25°C, pH 7.0)
	Глиоксил-агароза 10BCL Glyoxyl-agarose 10BCL	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	—	0,9 (гидролиз п-НФП, 25°, pH 7,0) 0.9 (hydrolysis of p-NPP, 25°C, pH 7.0) 0,8 (гидролиз ЭБ, 25°, pH 7,0) 0.8 (hydrolysis of ethyl butyrate, 25°C, pH 7.0)
	Глутаральдегид-агароза 10BCL Glutaraldehyde-agarose 10BCL	Ковалентное связывание Covalent bonding	—	0,85 (гидролиз п-НФП, 25°, pH 7,0) 0,85 (hydrolysis of p-NPP, 25°C, pH 7,0) 0,85 (гидролиз ЭБ, 25°, pH 7,0) 0,85 (hydrolysis of EB, 25°C, pH 7.0)

**Properties of Biocatalysts based on CALB**

определяемая как количество липазы, образующей 1 мкмоль продукта в минуту в стандартных условиях; ИЖ — ионная жидкость; п-НФП — п-нитрофенилпропионат; ПП — площадь поверхности; ПУ — полиуретан(овый); ТБ — трибутирин; ФБ — фосфатный enantiomeric excess (энантимерный избыток); *E* — энантиоселективность, соотношение мольных концентраций энантимеров; Lewatit VP OC 1600; РВ — фосфатный буфер; PEG 200 — полиэтиленгликоль с ММ 200; PEI — полиэтиленимин; TMOS — тет-

Свойства биокатализатора Characteristics of biocatalyst	Применение биокатализатора Use of biocatalyst			
Остаточная активность после инкубации, % (условия) Residual activity after incubation, % (conditions)	Целевая реакция (условия) Target reaction (conditions)	Степень трансформации, % (время реакции); энантиоселективность ( <i>ee</i> , <i>E</i> ) Degree of transformation, % (time of reaction); enantioselectivity ( <i>ee</i> , <i>E</i> )	Остаточная активность БК, % (количество циклов) Residual activity of biocatalyst, % (number of cycles)	Ссылки References
6	7	8	9	10
100 (60 ч, pH 7,0, 50°) 100 (60 h, pH 7.0, 50°C) 100 (200 ч, pH 7,0, 25°, 50% диоксан) 100 (200 h, pH 7.0, 25°C, 50% dioxane)	—	—	—	
70 (60 ч, pH 7,0, 50°) 70 (60 h, pH 7.0, 50°C)	—	—	—	[116]
57 (60 ч, pH 7,0, 50°) 90 (200 ч, pH 7,0, 25°, 50% диоксан) 57 (60 h, pH 7.0, 50°C) 90 (200 h, pH 7.0, 25°C, 50% dioxane)	—	—	—	

1	2	3	4	5
2	Octadecyl-Sepabeads (полиметакрилат) (polymethacrylate)	Адсорбция Adsorption	–	–
	Глиоксил-агароза Glyoxyl-agarose	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	–	–
	PEI-agarose (полиэтиленимин) (polyethyleneimine)	Ионное связывание Ionic bonding	–	–
	CNBr-agarose	Одноточечное ковалентное связывание (с концевой аминогруппой) One-point binding (with end aminogroup)	–	–
	Глутаральдегид- агароза Glutaraldehyde-agarose	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	–	–
	Eupergit-Cu <sup>2+</sup> + (полиметакрилат) (polymethacrylate)	Координационно-ионное связывание Coordination binding	–	–
	Нативный фермент Native enzyme	–	–	–
3	Octadecyl-Sepabeads (полиметакрилат) (polymethacrylate)	Адсорбция Adsorption	–	300*
	Глиоксилагароза Glyoxyl-agarose	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	–	66*
	DS-agarose (сульфат декстрана) (dextrane sulfate)	Ионное связывание Ionic bonding	–	4*
	PEI-agarose (полиэтиленимин) (polyethyleneimine)	Ионное связывание Ionic bonding	–	30*
4	PEI-agarose (полиэтиленимин) (polyethyleneimine)	Ионное связывание Ionic bonding	42	–
	Octyl-agarose	Адсорбция Adsorption	100	–

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Энантиселективный гидролиз (кинетическое разделение) метилманделата (pH 7,0, 25°) Enantioselective hydrolysis (kinetic separation) of methyl mandelate (pH 7.0, 25°C)	13 (ee 82 E 12)	–	[98]
–		19 (ee 88 E 19)	–	
–		14 (ee >95 E 67)	–	
–		20 (ee 73 E 7,4)	–	
–		12 (ee 87 E 16)	–	
–		15 (ee 89 E 20)	–	
–		15 (ee 47 E 3)	–	
–		Энантиселективный гидролиз глицедилбутирата (10 % диоксан, ФБ, pH 7,0, 25°) Enantioselective hydrolysis of glycedyl butyrate (10% dioxane, PB, pH 7.0, 25°C)	60 (16 мин) (ee 40 E 2,5) 60 (16 min) (ee 40 E 2,5)	
–	55 (72 мин) (72 min) (ee 26 E 2,0)		–	
–	50 (1120 мин) (1120 min) (ee 44 E 3,0)		–	
–	60 (16 мин) (16 min) (ee 91 E 9,0)		–	
–	Региоселективный гидролиз 1,2,3,4,6-пента-О-ацетил-β-D-глюкопиранозы (10% ацетонитрил, ФБ, pH 5,0, 25°) Regioselective hydrolysis of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose (10% acetonitrile, PB, pH 5.0, 25° C)	100	–	[104]
–		70	–	

1	2	3	4	5
4	CNBr-sepharose	Одноточечное ковалентное связывание (с концевой аминогруппой) One-point covalent bonding (with end aminogroup)	16	–
5	Sepabeads EC-Octadecyl (полиметакрилат) (polymethacrylate)	Адсорбция Adsorption	91	59,8 (синтез бутилолеата) 59,8 (synthesis of butyloleate)
	Diaion HP20 (полистирол-дивинилбензол) (polystyrene divinyl benzene)	Адсорбция Adsorption	98	55,3 (синтез бутилолеата) 55,3 (synthesis of butyl oleate)
	Diaion SP207 (полистирол-дивинилбензол) (polystyrene divinyl benzene)	Адсорбция Adsorption	92	52,3 (синтез бутилолеата) 52,3 (synthesis of butyl oleate)
6	НКА-9 (макропористый полистирол) (macroporous polystyrene)	Адсорбция (изооктан, 30°, pH 6,0) Adsorption (isooctane, 30°, pH 6.0)	83,3	–
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	–

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Региоселективный гидролиз 1,2,3,4,6-пента-О-ацетил-β-D-глюкопиранозы (10% ацетонитрил, ФБ, pH 5,0, 25°) Regioselective hydrolysis of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-D-glucopyranose (10 % acetonitrile, PB, pH 5.0, 25° C)	100	–	[104]
–	–	–	–	
–	–	–	–	[117]
–	–	–	–	
95,6 (0,025 М ФБ, pH 6,0, 4 ч) (0.025 М PB, pH 6.0, 4 h)	Синтез этиллактата (изооктан, 50°, 24 ч) Synthesis of ethyl lactate (50°C, 24 h)	–	56,9 (7)	
77,3 (0,025 М ФБ, pH 9,0, 4 ч) (0.025 М PB, pH 9.0, 4 h)				
82,8 (0,025 М ФБ, pH 7,5, 40°, 1 ч) 82,8 (0,025 М PB, pH 7.5, 40°C, 1 h)	Гидролиз ОМ (pH 7,0, 40°, 30 мин) Hydrolysis of olive oil (pH 7.0, 40°C, 30 min)	–	24,7 (7)	[118]
34,5 (0,025 М ФБ, pH 7,5, 70°, 1 ч) (0.025 М PB, pH 7.5, 70°C, 1 h)				
97,2 (0,025 М ФБ, pH 6,0, 4 ч) 97,2 (0,025 М PB, pH 6.0, 4 h)	Синтез этиллактата (изооктан, 50°, 24 ч) Synthesis of ethyl lactate (isooctane, 50°C, 24 h)	–	58,2 (7)	

1	2	3	4	5
6	Нагивный фермент Native enzyme	–	–	–
7	Lewatit VP OC 1600 (Novozym® 435) полиметил-метакрилат, ПП 100–150 м <sup>2</sup> /г, поры 140–170 Å Lewatit VP OC 1600 (Novozym® 435) polymethyl meacrylate, surface area 100–150 м <sup>2</sup> /г, pore size 140–170 Å	Адсорбция Adsorption	–	11,5
	Amberlite XAD 7HP (акриловый полимер, ПП 420 м <sup>2</sup> /г, поры 450 Å) Amberlite XAD 7HP (acrylic polymer, surface area 420 м <sup>2</sup> /г, pore size 450 Å)		–	8,7

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
75,8 (0,025М ФБ, рН 9,0, 4 ч) 75.8 (0.025М РВ, рН 9.0, 4 h)	Синтез этиллактата (изооктан, 50°, 24 ч) Synthesis of ethyl lactate (isooctane, 50°C, 24 h)		58,2 (7)	
87,7 (0,025М ФБ, рН 7,5, 40°, 1 ч) 87.7 (0.025М РВ, рН 7.5, 40°C, 1 h)	Гидролиз ОМ (рН 7,0, 40°, 30 мин) Hydrolysis of olive oil (рН 7.0, 40°C, 30 min)	–	29,3 (7)	
26,2 (0,025М ФБ, рН 7,5, 70°, 1 ч) 26.2 (0.025М РВ, рН 7.5, 70°C, 1 h)				
89,4 (0,025М ФБ, рН 6,0, 4 ч) 89.4 (0.025М РВ, рН 6.0, 4 h)				[118]
62,7 (0,025М ФБ, рН 9,0, 4 ч) 62.7 (0.025М РВ, рН 9.0, 4 h)				
67,8 (0,025М ФБ, рН 7,5, 40°, 1 ч) 67.8 (0.025М РВ, рН 7.5, 40°C, 1 h)	–	–	–	
24,4 (0,025М ФБ, рН 7,5, 70°, 1 ч) 24.4 (0.025М РВ, рН 7.5, 70°C, 1 h)				
–	Полимеризация ε-КЛ, 70° Polymerization of ε-caprolactam, 70°C	95 (150 мин) ММ ПКЛ 6000 (240 мин) 95 (150 min) ММ of polycaprolactone = 6000 (240 min)	–	[119]
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerization of caprolactam, 70°C	95 (150 мин) ММ ПКЛ 7000 (180 мин) 95 (150 min) ММ of polycaprolac- tone = 7000 (180 min)	–	

1	2	3	4	5
7	Accurel (полипропилен, ПП 80–100 м <sup>2</sup> /г, поры 50–500 Å) (polypropylene, surface area 80–100 м <sup>2</sup> /g, pore size 50–500 Å)	Адсорбция Adsorption	–	13,1
	QDM 2-3-4 (модифицированный пропиленом диоксид кремния, ПП 106–320 м <sup>2</sup> /г, поры ≈100 Å) (propylene-modified silicon dioxide, surface area 106–320 м <sup>2</sup> /g, pore size ≈100 Å)		–	13,2
	Purolite AP 1090 (полистирол, ПП 20–25 м <sup>2</sup> /г, поры 1600–2300 Å) (polystyrene, surface area 20–25 м <sup>2</sup> /g, pore size 1600–2300 Å)		–	4,9
	Amberlite T XAD 1180 (полистирол, ПП 550 м <sup>2</sup> /г, поры 400–450 Å) (polystyrene, surface area 550 м <sup>2</sup> /g, pore size 400–450 Å)		–	8,7
	Deloxan HAP (полисилоксан, ПП 200 м <sup>2</sup> /г, поры 2000 Å) (polysiloxane, surface area 200 м <sup>2</sup> /g, pore size 2000 Å)		–	14,0
8	Silica MS-3030 (мезопористый кремнезем, модифицированный октилтриэтоксисиланом, ПП 300–320 м <sup>2</sup> /г, поры 30–40 нм) (mesoporous silica modified by octyltriethoxysilane, surface area 300–320 м <sup>2</sup> /g, pore size 30–40 nm)	Адсорбция Adsorption	(43–10,5)	(455–6700) (гидролиз ТБ, 25°, pH 7,0) (455–6700) (hydrolysis of tributyrin, 25°C, pH 7.0)

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerizaion of caprolactam, 70°C	85 (250 мин) Мм ПКЛ 15000 (60 мин) 85 (250 min) ММ of polycaprolactam 15000 (60 min)	–	
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerizaion of caprolactam, 70°C	≈100 (75 мин) ММ ПКЛ 10000 (60 мин) ≈100 (75 min) ММ of polycaprolactam 10000 (60 min)	–	
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerizaion of caprolactam, 70°C	≈100 (120 мин) ММ ПКЛ 6000 (60 мин) ≈100 (120 min) ММ of polycaprolactam 6000 (60 min)	–	[119]
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerizaion of caprolactam, 70°C	84 (250 мин) ММ ПКЛ 12000 (200 мин) 84 (250 min) ММ of polycaprolactam 12000 (200 min)	–	
–	Полимеризация КЛ, 70° Polymerizaion of caprolactam, 70°C	80 (300 мин) ММ ПКЛ 6000 (280 мин) 80 (300 min) ММ polycaprolactam 6000 (280 min)	–	
90 (0,5 ч) 79 (1 ч) 50 (2 ч) (0,05М ФБ, pH 7,0, 60°) 90 (0,5 h) 79 (1 h) 50 (2 h) (0.05M PB, pH 7.0, 60°C)	N-Ацилирование этанолamina лауриловой кислотой (ацетонитрил, 40°)  N-Acylation of ethanolamine by lauric acid (acetonitrile, 40°)	–	Octyl silica-CaLB: 100 (12) 90 (15) 40°	[108]

1	2	3	4	5
8				
9	Davicil®250 (мезопористый силикагель, поры 25 нм, модифицированный аминоалкил-фенильными группами) (mesoporous silicagel, pore size 25 nm, modified by aminoalkyl phenyl groups)	Адсорбция Adsorption	–	63,1
		Адсорбция, сшивка ГА Adsorption, linking with glutaraldehyde	–	36
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	17,7
10	Sepabeads EC-Octadecyl (полиметакрилат) (polymethyl acrylate)	Адсорбция Adsorption	90 (9 ч) (9 h)	105 (гидролиз триацетина) 2,1* 105 (hydrolysis of triacetin) 2.1*
	Diaion HP20 (полистирол-дивинилбензол, поры 200–300 Å) (polystyrene divinyl benzene, pore size 200–300 Å)	Адсорбция Adsorption	90 (12 ч) (12 h)	60 (гидролиз триацетина) 1,5* 60 (hydrolysis of triacetin) 1.5*
	MCI GEL CHP20P (полистирол-дивинилбензол, поры 400–600 Å) (polystyrene divinyl benzene, pore size 400–600 Å)	Адсорбция Adsorption	96 (2 ч) 96 (2 h)	270 (гидролиз триацетина) 2,5* 270 (hydrolysis of triacetin) 2.5*
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	75 (гидролиз триацетина) 75 (hydrolysis of triacetin)

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
<p>Нативный фермент: 5 (0,5 ч) 0 (1ч) (0,05М ФБ, рН 7,0, 60°)</p> <p>Native enzyme: 5 (0.5 h) 0 (1ч) (0.05M РВ, рН 7.0, 60°С)</p>			<p>Novozym® 435 100 (12) 100 (15) 40°</p>	[108]
<p>2 (2% тритон-Х-100, рН 7,5, 22°, 1,5 ч)</p> <p>2 (2% Triton X-100, рН 7.5, 22°С, 1.5 h)</p>	<p>Энантиселективное ацилирование (кинетическое разделение) 1-фенилэтанола Enantioselective acylation (kinetic separation) of 1-phenyl ethanol</p>	<p>45,8 (ee 99,7 E &gt;200)</p>	—	[15]
<p>84 (2% тритон-Х-100, рН 7,5, 22°, 1,5 ч)</p> <p>84 (2% Triton X-100, рН 7.5, 22°С, 1.5 h)</p>		<p>26,1 (ee 99,2 E &gt;200)</p>	—	
<p>42 (2% тритон-Х-100, рН 7,5, 22°, 1,5 ч)</p> <p>42 (2% Triton X-100, рН 7.5, 22°С, 1.5 h)</p>		<p>51 (ee 98,6 E &gt;200)</p>	—	
<p>90 (60°, 24 ч)</p> <p>90 (60°С, 24 h)</p>	—	—	—	[120]
<p>75 (25°, 24 ч, 10 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p> <p>75 (25°С, 24 h, 10 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p>				
<p>70 (60°, 24 ч)</p> <p>70 (60°С, 24 h)</p>	—	—	—	
<p>85 (25°, 24 ч, 10 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p> <p>85 (25°С, 24 h, 10М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p>				
<p>23 (60°, 24 ч)</p> <p>23 (60°С, 24 h)</p>	—	—	—	
<p>60 (25°, 24 ч, 10 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p> <p>60 (25°С, 24 h, 10М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)</p>				
<p>55 (60°, 24 ч)</p> <p>55 (60°С, 24 h)</p>	—	—	—	

1	2	3	4	5
11	Celite Bio-Catalyst Carrier R-633 (кремнезем) (silica)	Адсорбция Adsorption	–	–
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	–
12	NS 40013 (порошок кремнезема, частицы 300–1000 мкм) (silica powder, particle size 300–1000 mm)	Адсорбция, гранулирование Adsorption, granulation	68–78	41000 (гидролиз ТБ, 30°C, pH 7,0) 41000 (hydrolysis of tributyrin, 30°C, pH 7.0)
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	–
13	FDU-12 (мезопристый силикагель, поры типа клеток, d= 10,4) (mesoporous silicagel, pores of cell type, d= 10.4)	Ионное связывание Ionic bonding	28***	80* (гидролиз ТБ) 80* (hydrolysis of tributyrin)
	Me-FDU-12 (мезопристый силикагель, метиловые группы, поры типа клеток, d= 9,7) (mesoporous silicagel, methyl groups, pores of cell type, d= 9.7)	Ионное связывание, адсорбция Ionic bonding, adsorption	37***	110* (гидролиз ТБ) 110* (hydrolysis of tributyrin)
	SBA-15 (мезопристый силикагель, поры типа каналов, d= 8,8) (mesoporous silicagel, pores of channel type, d= 8.8)	Ионное связывание Ionic bonding	44***	60* (гидролиз ТБ) 60* (hydrolysis of tributyrin)
	Me-SBA-15 (мезопристый силикагель, метиловые группы, поры типа каналов, d= 7,9) (mesoporous silicagel, methyl groups, pores of channel type, d= 7.9)	Ионное связывание, адсорбция Ionic bonding, adsorption	23***	90* (гидролиз ТБ) 90* (hydrolysis of tributyrin)

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Энантиселективный синтез ацетата ароматического циангидрина (основание – Amberlite OH, толуол, 40°)	95 (ee 96)		[121]
–	Enantioselective synthesis of aromatic cyanohydrin acetate (base is Amberlite OH, toluene, 40°C)	82 (ee 93)	–	
–	Синтез изопропилмиристата (40°)	81 (50 мин) (50 min)	–	[5]
–	Synthesis of isopropyl myristate (40°C)	29 (50 мин) (50 min)	–	
90 (ФБ, pH 7,0, 120 мин) 90 (РВ, pH 7.0, 120 min)	–	–	–	
95 (ФБ, pH 7,0, 120 мин) 95 (РВ, pH 7.0, 120 min)	–	–	–	[122]
83 (ФБ, pH 7,0, 120 мин) 83 (РВ, pH 7.0, 120 min)	–	–	–	
88 (ФБ, pH 7,0, 120 мин) 88 (РВ, pH 7.0, 120 min)	–	–	–	

1	2	3	4	5
14	S (полистирол) (polystyrene)	Адсорбция Adsorption	–	3450 (синтез ПЛ) 978 (гидролиз ТБ) 3450 (synthesis of propyl laurate) 978 (hydrolysis of tributyrin)
	M (метакрилат) (metacrylate)	Ковалентное связывание Covalent bonding	–	3020 (синтез ПЛ) 490 (гидролиз ТБ) 3020 (synthesis of propyl laurate) 490 (hydrolysis of tributyrin)
	Celit R®-640 (кремнезем) (silica)	Адсорбция Adsorption	–	2050 (синтез ПЛ) 270 (гидролиз ТБ) 2050 (synthesis of propyl laurate) 270 (hydrolysis of tributyrin)
15	Accurel EP 100 (макропористый полипропилен) (macroporous polypropylene)	Адсорбция, сшивка ГА Adsorption, linkage with glutaraldehyde	41 (по белку) 41 (by protein)	36000 (гидролиз ТБ, 40°, pH 7,5) 36000 (hydrolysis of tributyrin, 40°C, pH 7.5)
	CLEAs- CALB	Сшивка ГА Linkage with glutaraldehyde	–	24000
	Lewatit VP OC 1600 (макропористый поли- акрилатный носитель, поры >100 нм) (macroporous polyacrylate carrier, pore size > 100 nm)	Адсорбция CALB-R1, биосилификация Adsorption of CALB-R1, biosilification	–	–
16		Адсорбция CALB-R1 Adsorption of CALB-R1	–	–

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
-		30(метанол-триолеин=1:1)	≈90 (10) (1:1, 30°, 4 ч)	
		30 (methanol-trioleine=1:1)	≈90 (10) (1:1, 30°C, 4 h)	
		58 (2:1)		
		29 (3:1)		
-	Переэтерификация триолеина метанолом (30°, 25 ч) Transesterification of trioleine with methanol (30°C, 25 h)	28 (метанол-триолеин=1:1) (methanol?trioleine=1:1)	-	[51]
		11 (2:1)		
		5 (3:1)		
-		< 5 (48 ч) (48 h)	-	
-	Энантиоселективное ацилирование (кинетическое разделение) 1-фенилэтанола (ИЖ [BMIm][NO <sub>3</sub> ]) Enantioselective acylation (kinetic separation) of 1-phenyl ethanol (ionic liquid [BMIm][NO <sub>3</sub> ])	50 ee >99 (100 ч) (100 h)	-	
	Переэтерификация этилбутирата (ионная жидкость BMIm][dca]) Transesterification of ethyl butyrate (ionic liquid BMIm][dca])	80 (7 ч) 80 (7 h)		[19]
-	Переэтерификация этилбутирата (ионная жидкость [BMIm][dca]) Transesterification of ethyl butyrate (ionic liquid BMIm][dca])	7 (5 ч) 7 (5 h)	-	
105 (50°, 1 ч) 64 (70°, 1 ч) 105 (50°C, 1 h) 64 (70°C, 1 h)	Гидролиз п-НФБ Hydrolysis of p-NPB	-	100 (5)	[123]
92 (50°, 1 ч) 37 (70°, 1 ч) 92 (50°C, 1 h) 37 (70°C, 1 h)		-	30 (5)	

1	2	3	4	5
16	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	–
17	PGMA (гигапористый полиглицидил метакрилат, поры 270 нм) (gigaporous polyglycidyl metacrylate, pore size 270 nm)	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	259,7**	493,8 9,9* (гидролиз оливкового масла) (hydrolysis of olive oil)
	PST (гигапористый полистирол, поры 276 нм) (gigaporous polystyrene, pore size 276 nm)	Адсорбция Adsorption	109,6**	74,8 4,2*
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	39,5**	293,8 1,5*
	Нативный фермент Native enzyme	–	–	3,8*
18	Serabeads (метакриловый полимер с эпоксигруппами) (metacrylic polymer)	Многоточечное ковалентное связывание гликозилированной CALB Multipoint covalent bonding of glycosylated CALB	85 (по белку) 85 (by protein)	92 Ед/г <sub>сух</sub> (гидролиз п-нитрофенилпальмитата) 92 U/g <sub>dry</sub> (hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate)
	Serabeads (метакриловый полимер с аминогруппами) (metacrylic polymer with aminogroups)		98 (по белку) 98 (by protein)	25 Ед/г <sub>сух</sub> 25 U/g <sub>dry</sub>
	Serabeads (метакриловый полимер с аминогруппами, активированными ГА) (metacrylic polymer with aminogroups activated by glutaraldehyde)		89 (по белку) 88 (by protein)	44 Ед/г <sub>сух</sub> 44 U/g <sub>dry</sub>
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	2,1 Ед/г <sub>сух</sub> 2.1 U/g <sub>dry</sub>
	Нативный фермент Native enzyme	–	–	45 Ед/мг (гидролиз ТБ) 45 U/mg (hydrolysis of tributyrin)

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
70 (50°, 1 ч) 25 (70°, 1 ч) 70 (50°C, 1 h) 25 (70°C, 1 h)	Гидролиз п-НФБ Hydrolysis of p-NPB	–	30 (5)	[123]
92 (50°, 6 ч) 57 (70°, 6 ч) 92 (50°C, 6 h) 57 (70°C, 6 h)	Гидролиз ОМ (37°, ФБ) Hydrolysis of olive oil (37°C, PB)	59, 42 (120 мин) (120 min)	70 (30)	[124]
90 (50°, 6 ч) 48 (70°, 6 ч) 90 (50°C, 6 h) 48 (70°C, 6 h)		≈25 (120 мин) (120 min)	47 (30)	
90 (50°, 6 ч) 48 (70°, 6 ч) 90 (50°C, 6 h) 48 (70°C, 6 h)		≈25 (120 мин) (120 min)	55 (30)	
40 (50°, 6 ч) (70°, 6 ч) 40 (50°C, 6 h) (70°C, 6 h)		10,3 (120 мин) (120 min)	–	
40 (50°, 120 мин, 0,025М ФБ, pH 7,5) 40 (50°C, 120 min, 0.025М PB, pH 7.5)	–	–	–	
80	–	–	–	
20 (60 мин) (60 min)	–	–	–	[106]
88	–	–	–	
70	–	–	–	

1	2	3	4	5
19	CNBr-Sepharose 4BCL	<p>Одноточечное ковалентное связывание (с концевой аминогруппой), 1% тритон X-100</p> <p>One-point covalent bonding (with end aminogroup), 1% Triton X-100</p>	>90	<p>95,6 (гидролиз п-НФП, 25°, 0,025М ФБ, pH 7,0)</p> <p>95.6 (hydrolysis of p-NPP, 25°C, 0.025M PB, pH 7.0)</p>
20	Amberzyme beads (макропористый метилметакрилат, эпоксигруппы, поры 220 Е) (macroporous methyl metacrylate, epoxy groups, pore size 220 E)	Ковалентное связывание Covalent bonding	—	—
	nanoPSG, (полиглицидилметакрилат, частицы 68 нм) (polyglycidyl metacrylate, particle size 68 nm)	Ковалентное связывание Covalent bonding	—	—
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	—	—

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Гидролиз п-НФП, 0,1% тритон X-100 Hydrolysis of p-NPP, Triton X-100	–	100 (1)	[125]
	Гидролиз этилового эфира масляной кислоты Hydrolysis of ethyl ether of butyric acid		108 (1)	
	Энантиселективный гидролиз (±)-2-О-бутирил-2- фенилуксусной кислоты Enantioselective hydrolysis of (±)-2-O- butyryl-2-phenylacetic acid		57 (1)	
	Энантиселективный гидролиз этилового эфира (±)-2-гидрокси- 4-фенилмасляной кислоты Enantioselective hydrolysis of ethyl ether of (±)-2-hydroxy- 4-phenylbutyric acid		100 (1)	
–	Полимеризация КЛ (толуол, 70°) Polymerization of caprolactam (toluene, 70°C)	78 (140 мин) 78 (140 min)	78 (3)	[126]
–		98 (25 мин) 98 (25 min)	–	
–		85 (80 мин) 85 (80 min)	82 (3)	

1	2	3	4	5
21	Eupergit C (эпоксигруппы) (epoxygroups)	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	50	15,4 (гидролиз п-НФП, 25°, 0,025М ФБ, pH 7,0) (hydrolysis of p-NPP, 25° C, 0.025M PB, pH 7.0)
	Eupergit C (группы этилендиамина) (ethylenediamine groups)	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	44,2	10,5
	Eupergit C (группы иминодиаце- тиловой кислоты) (iminodiacetylic acid groups)	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	19	6,7
	Eupergit C (группы иминодиаце- тиловой кислоты, металхелатные группы Cu <sup>2+</sup> ) (iminodiacetylic acid groups, metal-chelating groups Cu <sup>2+</sup> )	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	41	13,2
22	Immobead 150 (глиоксильные группы, поры ≈15нм) (glyoxylic groups, pore size ~15 nm)	Многоточечное ковалентное связывание Multipoint covalent bonding	86,7	–
23	Аминированная октил-сефароза Amidated octyl-Sepharose	Ковалентное связывание, сшивка ГА Covalent bonding, linkage with glutaraldehyde	–	–
	Без носителя (CLEA-BSA-CALB) Without carrier (CLEA-BSA-CALB)	Сшивка ГА CALB и BSA Linkage of CALB and BSA by glutaraldehyde	–	–
24	Полиуретановые (ПЕГ-ПУ) наночастицы Polyurethane (PEG-PU) nanoparticles	Инкапсулирование с образованием ПУ наночастиц Incapsulation with the formation of PU nanoparticles	82,4	21 Ед/мг (синтез ПЛ) 21 U/mg (synthesis of propyl laurate)

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–		76 (ee 96 E 65)	60 (4)	
–	Кинетическое разделение рацематов атенолола в реакции энантиоселективной перэтерификации (толуол, 25°С, 48 ч) Kinetic separation of atenolol racemates in the reaction of enantioselective transesterification (toluene, 25°C, 48 h)	55 (ee 85 E 29)	–	
–		41 (ee 74 E 19)	–	[6]
–		27 (ee 66 E 13)	–	
50 (40°, 0,83 ч) 50 (50°, 0,34 ч) 50 (60°, 0,29 ч) 50 (40°C, 0.83 h) 50 (50°C, 0.34 h) 50 (60°C, 0.29 h)		Этерификация масла сои метиловым эфиром (25°) Etherification of soybean oil by methyl ether (25°C)	72,3 (4 ч) 72.3 (4 h)	–
95 (68°, 1 ч) 95 (68°C, 1 h)	–	–	–	
50 (68°, 1 ч) 50 (68°C, 1 h)	–	–	–	[97]
67(40°), 25(50°), 14,8 (60°), 3 ч 67(40°C), 25(50 C), 14.8 (60 C), 3 h	Этерификация лауриловой кислоты н-пропиловым спиртом Etherification of lauric acid with n-propyl alcohol	–	–	
<10, нативный фермент <10, native enzyme		–	–	[127]

1	2	3	4	5
25	Полиуретановые частицы Polyurethane particles	Инкапсулирование с образованием ПУ частиц Incapsulation with formation of PU particles	–	800 (синтез этилолеата, 1:1,40°, 40 мин) 800 (synthesis of ethylolate 1:1,40°C, 40 min)
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	–
26	MWCNTs-EDAC (мультистенные карбонанотрубки, модифицированные EDAC) (multiwall carbonanotubes modified with EDAC)	Ковалентное связывание Covalent bonding	–	–
	MWCNTs-APTES-SAA-EDAC (мультистенные карбонанотрубки, модифицированные APTES-SAA-EDAC) (multiwall carbonanotubes modified with APTES-SAA-EDAC)	Ковалентное связывание Covalent bonding	–	–
27	Без носителя (CLEAs-PEG200) Without carrier (CLEAs-PEG200)	Поперечно-шитые ферментные агрегаты Cross-linked enzyme aggregates	253,2****	9,188*
	Без носителя (CLEAs-Acetone) Without carrier (CLEAs-Acetone)		201,6****	7,125*
	Порошок CALB CALB powder	Осаждение ацетоном Precipitation by acetone	100	6,588*
28	TMOS (гидрофильная матрица) (hydrophilic matrix)	Включение в золь-гель матрицу Inclusion in sol-gel matrix	–	(гидролиз п-нитро-фенилпальмитата) 0,14 9,71* (hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate 0,14 9,71*)
	MTMS-TMOS (амфи-фильная матрица) (amphiphilic matrix)	–	–	0,48 13,40*

Продолжение таблицы

6	7	8	9	10
–	Этерификация масла сои метиловым эфиром (обработка ультразвуком) Etherification of soybean oil by methylester (sonication)	81,6 (200 ч) (200 h)	23,8 (4) 3,8 (5)	[128]
–		94,7 (200 ч) (200 h)	–	
85±5 (4°, 4 мес) 85±5 (4°C, 4 month)	Синтез пентилвалериата Synthesis of pentylvalerate	85±5	≈79 (50)	[129]
83±2 (4°, 4 мес) 83±2 (4°C, 4 month)	Синтез пентилвалериата Synthesis of pentylvalerate	87±5	≈30 (50)	
–	–	–	–	[130]
–	–	–	–	
–	–	–	–	
–	–	–	–	[94]
–	–	–	–	

1	2	3	4	5
28	ETMS-TMOS (амфифильная матрица) (amphiphilic matrix)	Включение в золь-гель матрицу Inclusion in sol-gel matrix	–	0,58 21,03*
		Включение в золь-гель матрицу (предварительная обработка ОМ+ГА) Inclusion in sol-gel matrix (preliminary treatment with olive oil + glutaraldehyde)	–	0,60 33,81*
		Включение в золь-гель матрицу (предварительная обработка ОМ)	–	0,90 47,23*
	Нативный фермент Native enzyme	–	–	–
29	Без носителя (CLEA) Without carrier (CLEA)	Поперечно-сшитые ферментные агрегаты Cross-linked enzyme aggregates	–	28000
	Novozym® 435	Адсорбция Adsorption	–	3500
	Нативный фермент Native enzyme	–	–	–

\*Удельная активность, Ед/мг белка.

\*\*Отношение удельной активности биокатализатора к удельной активности нативного фермента.

\*\*\*Нагрузка по белку, мг/г носителя.

\*\*\*\*Процент иммобилизованного фермента от исходного количества порошка CALB.

ee — энантиомерный избыток, разность мольных долей энантиомеров, %.

Окончание таблицы

6	7	8	9	10
55 (60°, 8 ч)	Этерификация масла метиловым эфиром (50°, исходная концентрация ОМ:MeOH 1:3) Etherification of oil by methylester (50°C, starting ratio olive oil: MeOH = 1:3 <hr/> (исходная концентрация ОМ:MeOH 1:1, добавка MeOH каждые 3 ч) (starting ratio olive oil–MeOH = 1:3, MeOH is added each 3 h)	21,4	–	[94]
90 (60°, 8 ч)		60 (24 ч)		
		48.3		
90 (60°C, 8 h)		86 (24 ч)		
–		52,8		
–	90 (24 ч) 90 (24 h)			
20 (60°, 8 ч) (60°C, 8 h)	–	–	–	
–	Кинетическое разделение 1-фенилэтанола в реакции этерификации винилацетатом (scCO <sub>2</sub> , 40°, 2,5 ч, 90 бар) Kinetic separation of 1-phenylethanol in reaction of etherification by vinyl acetate (scCO <sub>2</sub> , 40°C, 2.5 h, 90 bar)	48 (ee 91 E 640)	–	27
–		50 (ee 20 E 240)	–	
–		<1 (ee 2) –	–	

\*Specific activity, U/ mg protein.

\*\*Ratio of specific activity of biocatalyst to specific activity of native enzyme.

\*\*\*Protein load, mg/g carrier.

\*\*\*\*Percentage of immobilized enzyme of initial amount of CALB powder.

ee, enantiomeric excess, difference of molar concentrations of enantiomers, %.

Повышение скорости энантиоселективного синтеза эфиров циангидрина, а также селективности процесса было достигнуто при замене Novozym® 435, получаемого адсорбционной иммобилизацией CALB на гидрофобном полиметакрилатном носителе, на фермент, адсорбционно иммобилизованный на гидрофильном природном силикате Celite® R-633, способном удалять воду из реакционной среды, смещая тем самым равновесие реакции в сторону синтеза целевого продукта (см. таблицу, № 11) [85, 121, 145]. Продемонстрирована высокая эффективность БК в форме гранулята кремнезема, содержащего адсорбционно иммобилизованную CALB, в процессе синтеза изопропилмиристата (см. таблицу, № 12) [5]. Изучено влияние на адсорбционную иммобилизацию CALB природы поверхности и структуры упорядоченных мезопористых силикатных материалов: размера пор и их типа, внутренней поверхности носителя, наличия привитых метильных групп [122, 144]. Показано, что в отличие от носителей, обладающих порами-каналами, материалы с порами типа «клетки» удерживают фермент, не давая ему вымываться в водную среду. Гидрофобизация поверхности силикатов привитыми метильными группами повышает активность иммобилизованной CALB (см. таблицу, № 13). Однако БК, полученный адсорбционной иммобилизацией CALB на гидрофильном макропористом носителе Celite® R-640, оказался неэффективным в процессе метанолиза триолеина, протекающем в среде с низким содержанием воды, в отличие от фермента, адсорбированного на гидрофобном макропористом полистироле [51]. Это связано, вероятно, с затруднением транспорта масляного субстрата в поры гидрофильного носителя, так как адсорбированная на силикатном носителе CALB обладала активностью как при синтезе пропиллаурата, так и при гидролизе трибутирина, хотя и в меньшей степени, чем гидрофобно адсорбированный фермент (см. таблицу, № 14).

Можно заключить, что при получении БК путем адсорбционной иммобилизации CALB выбор оптимального носителя определяется условиями целевого биокаталитического процесса: при синтезе в среде органических растворителей более эффективными оказываются БК, полученные с использованием макропористых гидрофобных полимеров (или полимеров с гидрофобизованной поверхностью). Для протекающих в водной среде процессов синтеза и гидролиза перспективными представляются БК на основе гидрофильных силикатных матриц.

Наиболее широко используемым технологическим БК на основе CALB является коммерче-

ски доступный Novozym® 435 [65, 85, 114, 115, 146—148], представляющий собой фермент, продуцируемый рекомбинантным штаммом *Aspergillus niger* [15, 101] и иммобилизованный путем физической адсорбции на макропористом гидрофобном полимерном носителе Lewatit® VP OC 1600 (сополимер метил- и бутилметакрилата, сшитый дивинилбензолом) [85, 114, 119, 126]. К недостаткам этого БК следует отнести невысокую механическую прочность и операционную стабильность [114, 115], а также большую стоимость, делающую экономически нецелесообразным его использование при производстве недорогих продуктов. Novozyme® 435 абсолютно непригоден к использованию в средах, содержащих поверхностно-активные вещества, нарушающие гидрофобное взаимодействие между ферментом и носителем [149]. Кроме того, было показано, что в органических растворителях и ионных жидкостях, являющихся средой для биокаталитических трансформаций, катализируемых Novozym® 435, наблюдается смывание CALB с носителя и загрязнение реакционной смеси органическими соединениями, часть из которых являются потенциальными субстратами CALB [126, 150, 151]. Продемонстрировано вымывание CALB и из других БК, полученных путем адсорбционной иммобилизации фермента, например, в [15, 101, 122].

Проблема достижения необратимой фиксации адсорбционно-иммобилизованной CALB может быть решена путем ковалентной внутри- и межмолекулярной сшивки адсорбированного фермента с помощью бифункционального реагента, в качестве которого чаще всего используют глутаровый альдегид (ГА) [15, 19, 152]. Для ковалентной сшивки белковой последовательности липазы из *Candida* sp. 99-125, адсорбированной на мезопористых носителях, описано также успешное использование сшивающего агента Genipin, представляющего собой агликон иридоида, производимый из природного сырья [153].

Постиммобилизационная межмолекулярная сшивка адсорбированного фермента, как правило, несколько снижает активность получаемого БК, однако это компенсируется значительным повышением его операционной стабильности благодаря увеличению жесткости белковой глобулы и ее устойчивости к денатурирующим воздействиям pH, температуры и органических растворителей [15, 19, 152]. Продемонстрировано, что модификация иммобилизованного фермента глутаровым альдегидом в специальных условиях, обеспечивающих преимущественное образование внутримолекулярной сшивки, приводит к большему увели-

чению стабильности CALB, адсорбированной на октилагарозе, чем в случае межмолекулярной сшивки фермента [152].

Сшивка глутаровым альдегидом CALB, адсорбированной на полипропиленовом носителе, позволила получить биокатализатор, устойчивый к денатурирующему воздействию ионных жидкостей и способный с высокой энантиоселективностью осуществлять ацилирование 1-фенилэтанола и 1-фениламина трет-бутиловым спиртом (см. таблицу, № 15) [19]. При ковалентной сшивке глутаровым альдегидом CALB, иммобилизованной на мезопористом силикагеле с привитыми фенильными и/или аминоалкильными группами, получены биокатализаторы, обладающие несколько меньшей активностью, чем адсорбционно иммобилизованный на тех же носителях фермент, однако существенно превосходящие последний по устойчивости к действию детергента и по операционной стабильности в процессах кинетического разделения рацематов хиральных спиртов или аминов путем их энантиоселективного ацилирования (см. таблицу, № 9) [15]. Лучший результат получен при сшивке глутаровым альдегидом CALB, адсорбированной на силикагеле, модифицированном совместно фенильными остатками, гидрофобизирующими поверхность носителя, и аминоалкильными группами, обеспечивающими сшивку белковых молекул не только друг с другом, но и с привитыми аминоклассами носителя (см. таблицу, № 9).

Описана постиммобилизационная обработка CALB, адсорбционно связанной с носителями, различными реагентами, модифицирующими поверхность белка (этилендиамином, янтарным ангидридом, 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой). Такая обработка приводила к повышению температурной и pH-стабильности биокатализаторов, а также их активности и энантиоселективности в процессах кинетического разделения (R/S)-метилманделата в водной среде и этерификации при синтезе бета-блокаторов, таких как пропранолол и атенолол [154].

Постиммобилизационная обработка Novozym® 435 силиконом с сохранением 60% исходной активности [155] позволила многократно повысить операционную стабильность иммобилизованной CALB в процессах синтеза ряда эфиров и кинетического разделения гас-1-фенилэтанола за счет предотвращения утечки фермента с носителя в присутствии поверхностно-активных веществ и увеличения механической прочности БК [149].

В работе [123] был предложен интересный комбинированный метод иммобилизации CALB, состоящий в адсорбции фермента на гидрофоб-

ном метакрилатном носителе и последующей его фиксации путем так называемой «биосилификации», т.е. вшивания в силикатный гель, образуемый из тетраметилортосиликата, через пептид силлафин, связанный с С-концом фермента. Такая ковалентная фиксация адсорбированной CALB не только исключает вымывание фермента из биокатализатора, но и приводит к значительному повышению его термостабильности (см. таблицу, № 16).

#### **ИММОБИЛИЗАЦИЯ CALB ПУТЕМ КОВАЛЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ С НОСИТЕЛЕМ. КОНФОРМАЦИОННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

Ковалентное присоединение фермента к носителю является востребованным методом иммобилизации, поскольку обеспечивает необратимое связывание белка и, как правило, позволяет выбрать методику, приводящую к получению стабильного биокатализатора. Более значительные потери активности по сравнению с адсорбционной иммобилизацией компенсируются высокой операционной стабильностью получаемых БК и отсутствием белкового загрязнения реакционной смеси.

В ковалентном связывании фермента участвуют функциональные группы боковых цепей аминокислот белка, такие как аминоклассы лизина или аргинина, карбоксильные группы аспарагиновой или глутаминовой кислот, гидроксильные группы серина или треонина и тиоловые группы цистеина [7, 87-100], а также N-концевые аминоклассы полипептидных цепей [7]. Ковалентное связывание CALB с носителями осуществляют, как правило, через первичные аминоклассы остатков лизина и N-концевую аминоклассу. В качестве носителей для ковалентной иммобилизации CALB был опробован широкий спектр материалов, среди которых предпочтительными являются различные макро- и мезопористые природные или синтетические полимеры, несущие следующие функциональные группы: эпоксидные, обеспечивающие связывание белка через его первичные аминоклассы по реакции нуклеофильного замещения [6, 106, 124, 133]; альдегидные, образующие с аминоклассами фермента основания Шиффа [101, 111, 140, 142]; аминоклассы, способные связываться с аминоклассами CALB через посредство диальдегидов (глутарового альдегида) [106, 125, 133, 156]; циан-бромидные, взаимодействующие с N-концевой первичной аминоклассой [101, 157]. Описано также связывание CALB через первичные аминоклассы с носителем через фотоактивируемое соединение 1-фтор-2-нитро-4-азидобензол [7].

Сопоставление препарата CALB, адсорбционно и ковалентно иммобилизованной на гигапористых гидрофобных полистирольных носителях, показало преимущество ковалентной иммобилизации [124]. БК, полученный путем ковалентной иммобилизации фермента через эпоксигруппы носителя, оказался в реакции гидролиза оливкового масла в 2,5 раза активнее коммерческого препарата Novozym® 435, а также биокатализатора, полученного путем адсорбции CALB на немодифицированном гигапористом полистироловом носителе (PST-CALB) (см. таблицу, № 17). Этот БК также показал более высокую термо- и операционную стабильность по сравнению с катализаторами, полученными адсорбционными методами.

Сравнительные исследования иммобилизации рекомбинантной гликозилированной CALB, продуцируемой *Aspergillus oryzae*, на эпокси- и аминоактивированных макропористых полиметакрилатных носителях (Sepabeads®) показали, что для связывания CALB предпочтительным является эпоксиактивированный носитель, возможно, из-за его меньшей гидрофильности [106]. БК, полученный связыванием CALB с эпокси-Sepabeads®, обладал более высокой гидролитической активностью, чем БК, полученные с использованием амино-Sepabeads®. При этом первый в 40 раз превосходил Novozym® 435 (CALB, адсорбированная на полиметакрилатном носителе) по гидролитической активности [106] (см. таблицу, № 18). Следует отметить, что увеличения термической стабильности у БК по сравнению со свободным ферментом не наблюдалось. Более высокая активность и операционная стабильность CALB, ковалентно иммобилизованной на эпокси-Sepabeads®, по сравнению с ферментом, связанным с амино-Sepabeads®, показана также в работе [133]. При этом оба БК на основе ковалентно связанной CALB существенно уступают по всем характеристикам ферменту, адсорбированному на гидрофобной поверхности носителя октадецил-Sepabeads®.

Поскольку реакционной способностью (нуклеофильностью) обладают лишь свободные (незаряженные) аминокислотные группы, решающую роль в процессе связывания белка играют значения  $pK_a$  аминокислотных остатков лизина и N-концевой аминокислотной группы, зависящие от их микроокружения, и величина pH, при которой протекает иммобилизация. Широкий диапазон pH-стабильности CALB (6—10) [7] позволяет осуществлять процедуру иммобилизации как при слабых и нейтральных, так и при щелочных значениях этого показателя. Поверхностные аминокислотные группы лизина, локализованные в гидрофильном микроокружении,

имеют высокие значения  $pK_a$ , поэтому они не протонированы и реакционноспособны лишь при щелочных pH, в то время как N-концевая первичная аминокислотная группа CALB при нейтральных pH, близких к pI, локализована в гидрофобной области белка напротив активного центра и может быть вовлечена в реакцию нуклеофильного замещения с активными группами носителя [7]. Указанные выше особенности реакционной способности первичных аминокислотных групп были использованы рядом исследователей для конформационной инженерии CALB [7, 101, 140, 156, 157]. Показано, что процедура иммобилизации CALB через N-концевую аминокислотную группу, осуществляемая при нейтральном pH, обеспечивает строго одноточечное связывание молекул белка с активированными носителями, причем все молекулы связываются в открытой активной форме с активным центром, обращенным в сторону носителя. Получаемые таким образом БК обладают высокой активностью, однако существенной стабилизации фермента не наблюдается (см. таблицу, № 2, 4, 9). Иммобилизация CALB при pH 10, напротив, приводит к увеличению жесткости белковой глобулы и стабилизации фермента за счет реализации многоточечного связывания белка с активированными носителями через поверхностные аминокислотные группы лизина, локализованные на стороне, противоположной активному центру. При многоточечном связывании активность иммобилизованной CALB часто снижается, так как фермент фиксируется жестко, причем часть молекул оказываются в неактивной форме (см. таблицу, № 1, 3, 14, 21, 22). Разные типы фиксации CALB сказываются также на ее селективности. Например, CALB, иммобилизованная путем многоточечного связывания с глиоксилагарозой (при pH 10), проявляла значительно более высокую энантиоселективность при гидролитическом разделении рацематов эфиров, чем БК, полученный при одноточечном связывании CALB с глутаральдегидагарозой (при pH 7) [101, 140] (см. таблицу, № 3).

Конформационные изменения белка при иммобилизации могут происходить не только в результате одноточечного или многоточечного связывания фермента с носителем, но также и благодаря фиксации белка в определенной ориентации при участии различных сегментов белковой глобулы. Такая фиксация реализуется за счет создания различных типов поверхности носителя путем прививки карбоксильных-, амино- или метал-хелатных групп [6, 84, 101, 104]. Эти методы конформационной инженерии позволяют многократно изменять активность фермента и влиять на его селек-

тивность, причем степень влияния существенно зависит от факторов целевого биокаталитического процесса, таких как pH, температура и растворители (см. таблицу, № 3, 4).

В работе [101] продемонстрировано влияние степени конформационной подвижности белковой глобулы CALB, обеспечиваемое различными методами иммобилизации (адсорбция на метакрилатном носителе или гидрофобизованном силикагеле, многоточечное ковалентное связывание с полимерным носителем и жесткое включение в гидрофобный золь-гель), на селективность фермента в процессе непрерывного кинетического разделения аминов и температурную зависимость этой селективности. Различные протоколы иммобилизации CALB на аминоктивированном носителе (ионная сила, присутствие детергентов, степень сшивки ГА), влияющие на количество связей фермент—носитель, жесткость белковой глобулы, ее ориентацию и конформацию, позволяют решающим образом варьировать активность, стабильность и селективность получаемого БК [125].

Методом конформационной инженерии CALB можно считать ее иммобилизацию в присутствии детергентов, (как правило, неионного детергента тритона X-100), что позволяет фиксировать фермент в открытой активной форме [84, 111, 125, 156, 157], создавая условия для получения активных БК (см. таблицу, № 19).

Продемонстрирована также возможность влияния на свойства CALB (активность, стабильность, селективность) путем постиммобилизационной химической модификации карбоксильных или первичных аминогрупп фермента, ковалентно или адсорбционно связанного с носителем, приводящей к гидрофиллизации или гидрофобизации поверхности белковой глобулы [158].

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОПЕРЕЧНОЙ СШИВКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CALB, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БЕЗ НОСИТЕЛЯ**

Поперечная сшивка ферментов бифункциональными реагентами позволяет получать биокатализаторы без носителя в форме аморфного осадка сшитого фермента (CLEs), образующегося при обработке растворенного белка, поперечно сшитых ферментных кристаллов (CLECs) и поперечно сшитых ферментных агрегатов (CLEAs), образующихся при воздействии на белковые агрегаты, предварительно осажденные из раствора [92, 93, 159—162]. Из трех форм БК без носителя наилучшую перспективу практического использования можно признать за CLEAs, принимая во внимание

дешевизну и простоту применяемых методик, высокую активность не обремененных балластным носителем БК, порой превышающую активность фермента в растворе, и часто наблюдаемую хорошую устойчивость к неблагоприятным воздействиям среды [159—162]. Низкая механическая прочность CLEAs является существенным недостатком [92], который пытаются преодолеть путем введения в их состав различных добавок [93, 161, 162] или комбинации поперечной сшивки с другими методами иммобилизации, например, с включением в полимерные оболочки [93, 161, 162].

Ферментные агрегаты CALB получают, осаждавая фермент из раствора сульфатом аммония [96, 130, 159, 163], полиэтиленгликолем (PEG) различной молекулярной массы [130, 163] или смешиваемыми с водой органическими растворителями: ацетоном [130, 163], 1,2-диметоксиэтаном [163, 164], 2-пропанолом [19, 130], трет-бутанолом [96, 97, 160] и др. [130, 160].

По данным, представленным в работе [160], где в качестве осадителей при получении CLEAs на основе различных ферментов были изучены одиннадцать органических растворителей, можно заключить, что в случае CALB лучшие результаты достигаются при использовании неполярных растворителей, таких как трет-бутанол, 1,2-диметоксиэтан и диметилсульфоксид (активность агрегатов CALB была равна активности фермента в растворе). При этом, однако, в качестве осадителя предпочтительнее использование сульфата аммония или PEG, что позволяет получать агрегированный препарат с активностью, на 30% превышающей активность растворенного фермента [160].

Скрининг различных осадителей для получения CLEAs на основе CALB (CALB-CLEAs) осуществлен также в работе [130]. Опробованы шесть органических растворителей, сульфат аммония и PEG с молекулярной массой 200 и 600. Повышение ферментативной активности CALB при синтезе пропиллаурата в 2—2,8 раза по сравнению со свободным ферментом наблюдалось при получении CLEAs с использованием ацетона, PEG200, PEG600 и сульфата аммония [130] (см. таблицу, № 27).

Для сшивки ферментных агрегатов и получения CLEAs на основе CALB в качестве бифункциональных агентов используют диальдегиды, в подавляющем большинстве случаев глутаровый альдегид [19, 96, 97, 130, 160, 163, 164]. Описано также применение для получения CLEAs полиальдегиддекстрана [161] и карбогидратных аналогов ГА, лучшим из которых применительно к CALB

оказался дигликольальдегид [165]. Диальдегиды взаимодействуют с аминокруппами на поверхности белка, в первую очередь, с первичными аминокруппами лизина, с образованием межбелковых сшивок. Образующиеся основания Шиффа могут быть восстановлены боргидридом натрия до замещенных аминов.

Получаемые осаждением ферментные агрегаты представляют собой надмолекулярные структуры размером от 1 до 100 мкм [160], фиксируемые обратимыми физическими взаимодействиями, при которых CALB может находиться в активированной форме. Поперечная сшивка глутаровым альдегидом фиксирует эти агрегаты с сохранением открытой активной структуры фермента, в связи с чем CALB в форме CLEAs может иметь более высокую активность, чем фермент в растворе [160]. Это продемонстрировано на примере получения CALB-CLEAs с выходом по активности около 180% при использовании в качестве осадителя PEG [160], 140% при использовании 1,2-диметоксиэтана и 125% при осаждении ацетоном [163]. Получение CLEAs в присутствии детергента (тритон X-100) или краун-эфира (crown ether) способствует сдвигу равновесия при осаждении агрегатов в сторону открытой формы фермента и ее последующей фиксации, что также обеспечивает повышение выхода активности при иммобилизации до 130—180 % [163].

В связи с тем, что в молекуле CALB количество первичных аминокрупп, доступных для взаимодействия с глутаровым альдегидом, невелико (9 боковых остатков Lys и N-концевая аминокруппа) и большая часть поверхности фермента их лишена [30, 106], стадия сшивки ферментных агрегатов при получении CLEAs может быть недостаточно эффективной. Это показано в работах [96, 97], когда вымывание мономерного фермента из препарата CALB-CLEAs наблюдалось в процессе электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Для совершенствования процесса сшивки ферментных агрегатов глутаровым альдегидом использованы такие подходы, как совместная агрегация и сшивка CALB и бычьего сывороточного альбумина (BSA) [96] и обогащение молекулы CALB первичными аминокруппами путем их прививки на поверхность белка при твердофазной химической обработке этилендиамином в присутствии карбодиимида [97]. Оба полученных биокатализатора в форме CLEAs демонстрируют прочное связывание CALB, которая не вымывается из препарата даже при кипячении с SDS [96, 97]. Оба они существенно превосходят по термической стабильности стандартный образец

CALB-CLEAs, полученный без добавок и аминирования липазы. При этом биокатализатор CLEAs на основе аминированной CALB превосходит CALB-BSA-CLEAs по термической стабильности и устойчивости в присутствии тетрагидрофурана (см. таблицу, № 23) [96, 97].

Следует сказать, что поскольку получение CLEAs является комплексным многофакторным процессом с ярко выраженным взаимным влиянием операционных параметров, для его оптимизации успешно используют методы математического планирования эксперимента [96, 97, 160].

Препараты типа CALB-CLEAs способны функционировать в органических растворителях [26, 27], ионных жидкостях [26] и сверхкритической двуокиси углерода ( $scCO_2$ ) [27, 166], проявляя при этом высокую стабильность при неблагоприятных воздействиях среды. В частности, продемонстрирована стабильность CALB-CLEAs к действию ионной жидкости [BMIm][dca], полностью инактивирующей нативный фермент [26]. Коммерчески доступный БК на основе CALB в форме CLEAs (CLEA® Technologies, Нидерланды) осуществлял реакцию трансэтерификации этилбутаноата 1-бутанолом в среде [BMIm][dca] вдвое быстрее, чем в трет-бутаноле [26]. Тот же коммерчески доступный БК показывал высокую степень конверсии и прекрасную энантиоселективность в непрерывных процессах кинетического разделения спиртов (1-фенилэтанола и  $\alpha$ -тетралола) путем их этерификации винилацетатом в  $scCO_2$  [27] (см. таблицу, № 29).

#### ДРУГИЕ МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ CALB

Описано получение БК на основе CALB путем ее включения в силикатный золь-гель с предиммобилизационной обработкой фермента субстратом (триглицеридом) и глутаровым альдегидом с целью его активации и стабилизации [94] (см. таблицу, № 28). БК предназначен для использования в процессах трансэтерификации масел метанолом при производстве биодизеля. Сочетание гидрофобного (этилтриметоксисилан) и гидрофильного (тетраметоксисилан) предшественников позволило получить амфифильную гелевую матрицу, обеспечивающую как доступ гидрофобных триглицеридов к ферменту, так и его защиту от инактивации метанолом и ингибирования глицерином, накапливающимся в системе. Комплексная оптимизация процессов иммобилизации CALB и трансэтерификации позволила достичь высокой эффективности процесса получения биодизеля [94] (степень конверсии 90 % за 24 ч).

CALB, иммобилизованная включением в гидрофобный золь-гель, обеспечивающий жесткое связывание белка с ограничением его конформационной подвижности, оказалась высоко селективной в процессах непрерывного кинетического разделения аминов, молекулы которых обладают большой конформационной гибкостью, например, ( $\pm$ )-4-фенил-бутан-2-амин [101].

Представляют интерес методы получения БК путем иммобилизации CALB на наночастицах, обладающих параметрами, благоприятными для проявления биокаталитической активности иммобилизованного фермента, такими как высокая удельная поверхность, доступность субстратов к активному центру, возможность использования высокой нагрузки по белку [127, 128, 167] (см. таблицу, № 24, 25).

Для иммобилизации CALB использованы полиуретановые наночастицы [127, 128]. Осуществление миниэмульсионной полимеризации в присутствии полиэтиленгликоля позволило многократно увеличить термическую стабильность фермента [127].

Ковалентной иммобилизацией CALB на мультитенных углеродных нанотрубках получен эффективный БК процесса синтеза пентилвалериата (выход синтеза 90 %), обладающий прекрасной операционной стабильностью (сохраняется 80 % активности после 50 циклов) и стабильностью к неблагоприятным воздействиям детергентов и высоких температур [129] (см. таблицу, № 26).

Описан метод получения БК на основе CALB, предназначенного для использования в неводных средах, путем иммобилизации фермента на коммерчески доступном пирогеинном силикате (fumed silica), представляющем собой непористые аморфные наночастицы двуокиси кремния, организованные в надмолекулярные структуры с хорошо развитой внутренней поверхностью [168, 169]. Иммобилизацию осуществляли путем лиофильной сушки суспензии носителя в водном растворе фермента. Оптимизация метода по нагрузке фермента на носитель показала, что активность БК возрастает вплоть до достижения степени покрытия поверхности носителя белком 230 %. Белок—белковые взаимодействия молекул CALB при ее многослойной иммобилизации являются, вероятно, причиной активации фермента [169]. Полученный описанным способом БК продемонстрировал толерантность к температурам до 70°, а также к воздействию органических растворителей и был успешно использован в процессе энантиоселективной трансэтерификации R/S-1-фенилэтанол а винилацетатом в среде гексана [169].

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ CALB В ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Представляют интерес исследования эффективности БК, полученных иммобилизацией CALB различными методами и согласно различным протоколам, в процессах, имеющих прикладное значение. Сопоставление БК, предназначенных для промышленного использования, проводится по таким критериям, как ферментативная активность, операционная стабильность, сочетающая стабильность CALB в условиях биокаталитической трансформации и механическую устойчивость носителя, а также экономическая эффективность процесса (например, затраты на единицу целевого продукта). Ниже приводится анализ на основании вышеприведенных критериев некоторых промышленных процессов с участием CALB.

**Процесс биокаталитической трансэтерификации триглицеридов** принадлежит к классу “зеленых” технологий производства биодизеля, биодетергентов и биосмазков из возобновляемого сырья или отходов пищевой промышленности.

Три макропористых БК на основе CALB были получены путем адсорбции фермента на полистироле, ковалентного связывания фермента с полиметакрилатом Sepabeads® и адсорбцией на силикатном носителе Celite® C-640. Эффективным в процессе трансэтерификации триолеина метанолом оказался только первый БК на основе гидрофобной полистирольной матрицы [51]. Высокая степень гидрофобности матрицы обеспечивает возможность транспорта масляного субстрата в поры БК и снижает как эффект ингибирования фермента метанолом, так и его непродуктивную адсорбцию на носителе. CALB, иммобилизованная адсорбцией на полистироле, была использована в 10 последовательных циклах метанолиза триолеина без потери эффективности [51], в то время как БК Novozym® 435 (CALB, адсорбированная на полиметакрилатном носителе Lewatit VPOC1600) в сходных условиях терял 10 % активности в каждом цикле [147]. Продемонстрирована эффективность CALB, иммобилизованной на макропористом полистироле, в процессе получения биодизеля путем метанолиза масла, извлекаемого из отработанной кофейной гущи (степень конверсии 72 % за 30 ч) [51].

В работе [95] показано, что операционная стабильность Novozym® 435 в процессе трансэтерификации 1-бутанолом масла подсолнечника, состоящего в основном из триолеина, невысока из-за адсорбции образующегося глицерина на по-

верхности носителя. Замена полиметакрилатного носителя на сильно гидрофобный полипропилен (Accurel MP1001) при получении БК на основе CALB позволила избежать адсорбции глицерина в ходе трансэтерификации и разработать высокоэффективный и дешевый биокаталитический процесс в реакторе непрерывного действия [95]. Проведена комплексная оптимизация процессов иммобилизации и биотрансформации по экономическим критериям эффективности.

Для утилизации глицерина, являющегося отходом производства биодизеля, предложен биокаталитический метод получения моноглицерида пальмитиновой кислоты путем этерификации в неводной среде. В качестве БК использованы препараты CALB-CLEAs [164]. Оптимизация условий получения биокатализатора и процесса этерификации позволила осуществить получение моноглицерида с выходом более 80 % за 20 ч.

**Разработка методов биокаталитического синтеза короткоцепочечных эфиров**, являющихся компонентами природных ароматических и вкусовых композиций, направлена на создание экологически чистых технологий получения натуральных вкусовых добавок для нужд пищевой промышленности.

В работе [115] методами математического планирования эксперимента осуществлена оптимизация процесса синтеза этилбутирата, являющегося одним из вкусовых и ароматических компонентов, естественно присутствующих в ананасах, манго и бананах. Для синтеза этого соединения были использованы два БК, полученные адсорбцией CALB на макропористых носителях — полиметакрилате (Novozym® 435) и гидрофобном стирол-дивинилбензоле (MCI-CALB). Показано, что различия в гидрофобности используемых носителей существенно влияют на оптимальные условия достижения одной и той же максимальной степени конверсии масляной кислоты в этилбутират с помощью этанола (85%), протекающей по механизму термодинамически контролируемого синтеза. Однако при этом производительность MCI-CALB была в 1,6 раза выше, чем Novozym® 435. Различия в оптимальных условиях синтеза являются результатом более высокой активности и стабильности MCI-CALB при высоких температурах в органическом растворителе, что позволяет эффективно осуществлять этерификацию при большей температуре и меньшем молярном избытке ацилирующего агента. Через 8 последовательных циклов синтеза, осуществляемого при оптимальных условиях в среде n-гексана, MCI-CALB сохранила 80% начальной активности (при 44°), а Novo-

zym® 435 — только 20% (при 37°) [115]. Существенно, что найденные аналогичным образом оптимальные условия синтеза бутилацетата [134], катализируемого теми же БК, отличаются от условий синтеза этилбутирата, обладающего более длинной и гидрофобной ацильной частью эфира и укороченной боковой цепью [115].

**Методы этерификации, аминирования и гидролиза хиральных органических соединений** являются разновидностью технологий разделения рацематов и получения оптически чистых изомеров для нужд, в первую очередь, фармацевтической промышленности. Разрабатываемые методы основаны на R-селективности CALB.

Два БК на основе CALB, полученные адсорбцией фермента на макропористых носителях полиметакрилате (Novozym® 435) и октадецил-Sepabeads®, использованы в процессе динамического кинетического этанолиза азлактона с раскрытием кольца с целью разделения энантиомеров ключевого полупродукта синтеза препарата оданакатиб (Odanacatib), предназначенного для лечения остеопороза [133]. CALB, иммобилизованная на гидрофобном носителе октадецил-Sepabeads®, оказалась в 1,5 раза активнее и в 15 раз стабильнее в целевом процессе по сравнению с Novozym® 435. Это позволило разработать дешевый и эффективный непрерывный колоночный метод динамического кинетического разделения взамен более дорогого процесса в реакторе, повысив при этом фактор энантиоселективности в 3 раза.

БК, полученный адсорбцией CALB на гидрофобизованном мезопористом силикагеле с последующей ковалентной фиксацией фермента глутаровым альдегидом, проявил высокую эффективность и селективность в процессе непрерывного кинетического разделения рацематов фениламинов в среде [15].

**Получение суперпластификатора для цементной промышленности.** Novozym® 435 был использован при создании экологически чистой биокаталитической технологии синтеза метакрилата метилполиэтиленгликоля — макромолекулярного мономера для получения поликарбосилата (суперпластификатора, повышающего прочность и износостойкость бетона и обеспечивающего экономии цемента) [148].

**Использование CALB для вторичной переработки полимерных материалов**, применяемых для упаковки пищевых продуктов описано в работе [14]. Высокая термостабильность CALB позволяет осуществлять процесс гидролиза алифатических полиэфиров, таких как полибутиленсукцинат, полигидроксibuтират, при 120° в среде ди-

хлорэтана. При этом сохраняется 40—25 % активности фермента после 5—30 мин экструзии. Полученные низкомолекулярные олиго- и мономеры могут быть повторно использованы для производства пищевой пленки.

Таким образом, изложенный в данном обзоре материал демонстрирует, что выбор метода иммобилизации CALB, природы носителя, а также протокола иммобилизации позволяет существенно варьировать активность, стабильность, специфичность и селективность получаемого биокатализатора. Это открывает широкие возможности для создания оптимального БК применительно к целевому биокаталитическому процессу.

Научные достижения в области изучения свойств CALB и создания технологических БК на ее основе имеют хорошую перспективу практического применения при разработке технологий получения хиральных продуктов и полупродуктов тонкого органического синтеза, биодизеля, ароматических эфиров, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов и полимеров для нужд фармацевтической, пищевой, парфюмерной и химической промышленности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.627.21.0002 от 11.11.2015, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI62715X0002).

The work was supported by the Ministry of Education and Science of RF (Grant Agreement N 14.627.21.0002, November 11, 2015; Agreement Unique Identifier RFMEFI62715X0002).

Получено 12.05.16

## ЛИТЕРАТУРА

- Heldt-Hansen, H.P., Ishii, M., Patkar, S.A., Hansen, T.T., Eigved, P. Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series 389. — Washington, DC: Am. Chem. Soc., 1989. — P. 158—172.
- Patkar, S.A. Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors / S.A. Patkar, F. Bjorkling, M. Zyndel, M. Schulein, A. Svendsen, H.P. Heldt-Hansen, E. Gormse // Indian J. Chem. Sec. B. — 1993. — V. 32. — P. 76—80.
- Dominguez de Maria, P. Biotechnological applications of *Candida Antarctica* lipase A: State-of-the-art / P. Dominguez de Maria, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. Van der Meer, R. van Gemert // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2005. — V. 37. — P. 36—46.
- Uppenberg, J. Crystallographic and molecular-modeling of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols / J. Uppenberg, N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones // Biochemistry. — 1995. — V. 34. — P. 16838—16851.
- Kirk, O. Lipase from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from unique origin / O. Kirk, M. Wurtz // Org. Proc. Res. Dev. — 2002. — V. 6 (4). — P. 446—451.
- Barbosa, O. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate / O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2011. — V. 71. — P. 124—132.
- Bukhari, A. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification / A. Bukhari, A. Idris, M. Atta, T.C. Loong // Chinese. J. Catal. — 2014. — V. 35. — P. 1555—1564.
- Rogalska, E. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases / E. Rogalska, C. Cudrev, F. Ferrato, R. Verger // Chirality. — 1993. — V. 5. — P. 24—30.
- Mattson, A. Resolution of diols with C2-symmetry by lipase catalysed transesterification / A. Mattson, N. Ohmer, K. Hult, T. Norin // Tetrahedron Asymm. — 1993. — V. 4. — P. 925—930.
- Partali, V. Enzymatic resolution of butanoic esters of 1-phenylmethyl and 1-[2-phenylethyl] ethers of 3-chloro-1,2-propanediol / V. Partali, V. Waagen, T. Alvik, T. Anthonsen // Tetrahedron Asymm. — 1993. — V. 4. — P. 961—968.
- Anderson, E.M. One biocatalyst — many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis / E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk // Biocatal. Biotransform. — 1998. — V. 16 (3). — P. 181—204.
- Gotor-Fernandez, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals / V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2006. — V. 40. — P. 111—120.
- Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds // Tetrahedron. — 2007. — V. 63 (8). — P. 1721—1754.
- Jbilou, F. A green method for polybutylene succinate recycling: Depolymerization catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* during reactive extrusion / F. Jbilou, P. Dole, P. Degraeve, C. Ladaviere // Eur. Polymer J. — 2015. — V. 68. — P. 207—215.
- Boros, Z. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations / Z. Boros, D. Weiser, M. Markus, E. Abahaziova, A. Magyar, A. Tomin, B. Koczka, P. Kovacs, L. Poppe // Proc. Biochem. — 2013. — V. 48. — P. 1039—1047.
- Park, S. Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant / S. Park, F. Viklund, K. Hult, R.J. Kazlauskas // Green Chem. — 2003. — V. 5. — P. 715—719.
- Lozano, P. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide / P. Lozano, T. de Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra // Chem. Comm. — 2002. — V. 17 (7). — P. 692—693.

18. Dhake, K.P. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of acetamides using [BMIm(PF<sub>6</sub>)] as a reaction medium / K.P. Dhake, Z.S. Qureshi, R.S. Singhal, B.M. Bhanage // *Tetrahedron Lett.* — 2009. — V. 50. — P. 2811—2814.
19. Ruiz Toral, A. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids / A. Ruiz Toral, A.P. de los R  os, J. Francisco, F.J. Hernandez, M.H.A. Janssen, R. Schoevaert, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon // *Enz. Microb. Technol.* — 2007. — V. 40. — P. 1095—1099.
20. Lamare, S. Production of natural esters at the pre-industrial scale by solid/gas biocatalysis / S. Lamare, B. Caillaud, K. Roule, I. Goubet, M.D. Legoy // *Biocatal. Biotransform.* — 2001. — V. 19. — P. 361—377.
21. Arroyo, M. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: A mechanistic approach / M. Arroyo, J.V. Sinisterra // *J. Org. Chem.* — 1994. — V. 59 (16). — P. 4410—4417.
22. Orrenius, C. The *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity / C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, G. Carrea // *Tetrahedron: Asymm.* — 1995. — V. 6(12). — P. 3023—3030.
23. Li, L. Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents / L. Li, F. Ji, J. Wang, Y. Li, Y. Bao // *Enz. Microb. Technol.* — 2015. — V. 69. — P. 46—53.
24. Gagnon, M.D. Effects of solvent and enzyme source on transesterification activity / M.D. Gagnon, P.T. Vasudevan // *Energy Fuels.* — 2011. — V. 25. — P. 4669—4674.
25. Kim, H.S. Effects of physicochemical properties of ionic liquids on butyl acetate synthesis using *Candida antarctica* lipase B / H.S. Kim, Y.M. Koo // *Korean J. Chem. Eng.* — 2012. — V. 29. — P. 1610—1614.
26. van Rantwijk, F. Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids / F. van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon // *Green Chem.* — 2006. — V. 8. — P. 282—286.
27. Hobbs, H.R. Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO<sub>2</sub> / H.R. Hobbs, B. Kondor, P. Stephenson, R.A. Sheldon, N.R. Thomas, M. Poliakoff // *Green Chem.* — 2006. — V. 8. — P. 816—821.
28. Santos, P. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide / P. Santos, C.A. Rezende, J. Martinez // *J. Supercrit. Fluids.* — 2016. — V. 107. — P. 170—178.
29. Persson, B.A. Ruthenium- and Enzyme-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols / B.A. Persson, A.L.E. Larsson, M. Le Ray, J-E. Backvall // *J. Am. Chem. Soc.* — 1999. — V. 121. — P. 1645—1650.
30. Uppenberg, J. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica* / J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones // *Structure.* — 1994. — V. 2. — P. 293—308.
31. Magnusson, A.O. An S-Selective Lipase Was Created by Rational Redesign and the Enantioselectivity Increased with Temperature / A.O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2005. — V. 44. — P. 4582—4585.
32. Escorcia, A.M. Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study / A.M. Escorcia, D. Molina, M.C. Daza, M. Doerr // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2013. — V. 98. — P. 21—29.
33. Escorcia, A.M. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B / A.M. Escorcia, M.C. Daza, M. Doerr // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2014. — V. 108. — P. 21—31.
34. Lutz, S. Engineering lipase B from *Candida Antarctica* // *Tetrahedron: Asymm.* — 2004. — V. 15. — P. 2743—2748.
35. Dodson, G. Catalytic triads and their relatives / G. Dodson, A. Wlodawer // *TIBS.* — 1998. — V. 23. — P. 347—352.
36. Brady, L. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase / L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huges-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge // *Nature.* — 1990. — V. 343. — P. 767—770.
37. Bornscheuer, U.T. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application / U.T. Bornscheuer, C. Bessler, R. Srinivas, S. Hari Krishna // *Trends Biotechnol.* — 2002. — V. 20. — P. 433—437.
38. Rauwerdink, A.M. How the same core catalytic machinery catalyzes seventeen different reactions: the Ser-His-Asp catalytic triad of  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold enzymes / A.M. Rauwerdink, R.J. Kazlauskas // *ACS Catal.* — 2015. — DOI: 10.1021/acscatal.5b01539. Publication Date (Web): 09 Sep 2015.
39. Orrenius, C. Chiral Recognition of Alcohol Enantiomers In Acyl Transfer Reactions Catalysed By *Candida antarctica* Lipase B / C. Orrenius, F. Haeffner, D. Rotticci, N. Ohrner, T. Norin, K. Hult // *Biocatal. Biotransform.* — 1998. — V. 16. — P. 1—15.
40. Kapoor, M. Lipase promiscuity and its biochemical applications / M. Kapoor, M.N. Gupta // *Proc. Biochem.* — 2012. — V. 47 (4). — P. 555—569.
41. Paiva, A.L. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases / A.L. Paiva, V.M. Balcao, F.X. Malcata // *Enz. Microb. Technol.* — 2000. — V. 27. — P. 187—204.
42. Lopresto, C.G. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized *Candida antarctica* lipase B / C.G. Lopresto, V. Calabro, J.M. Woodley, P. Tufvesson // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2014. — V. 110. — P. 64—71.
43. Cygler, M. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases / M. Cygler, J.D. Schrag // *Meth. Enzymol.* — 1997. — V. 284. — P. 3—27.
44. Miled, N. Interfacial catalysis by lipases / N. Miled, F. Beisson, J. de Caro, A. de Caro, V. Arondel, R. Verger // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2001. — V. 11. — P. 65—171.
45. Miled, N. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases / N. Miled, C. Bussetta, A. De Caro, M. Riviere, L. Berti, S. Canaan // *Compar. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* — 2003. — V. 136. — P. 131—138.

46. Reetz, M.T. Lipases as practical biocatalysts // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2002. — V.6. — P. 145—150.
47. Secundo, F. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity / F. Secundo, G. Carrea, C. Tarabiono, P. Gatti-Lafranceschi, S. Brocca, M. Lotti, K.E. Jaeger, M. Puls, T. Eggert // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2006. — V.39. — P. 166—170.
48. Ericsson, D.J. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation / D.J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Hedfors, A.G. Sandstrom, J.E. Backvall, S.L. Mowbray // *J. Mol. Biol.* — 2008. — V.376. — P. 109—119.
49. Skjot, M. Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: Lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties / M. Skjot, L. de Maria, R. Chatterjee, A. Svendsen, S.A. Patkar, P.R. Ostergraad, J. Brask // *ChemBioChem.* — 2009. — V.10. — P. 520—527.
50. Ferrario, V. Conformational changes of lipases in aqueous media: A comparative computational study and experimental implications / V. Ferrario, C. Ebert, L. Knapic, A. Basso, P. Spizzo, L. Gardossi // *Adv. Synt. Catal.* — 2011. — V.353. — P. 2466—2480.
51. Ferrario, V. Lipases Immobilization for Effective Synthesis of Biodiesel Starting from Coffee Waste Oils / V. Ferrario, H. Veny, E. De Angelis, L. Navarini, C. Ebert, L. Gardossi // *Biomolecules.* — 2013. — V.3. — P. 514—534.
52. Schmidt, R.D. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications / R.D. Schmidt, R. Verger // *Angewandte Chemie.* — 1998. — V.37. — P. 1608—1633.
53. Martinelle, M. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase / M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult // *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* — 1995. — V.1258. — P. 272—276.
54. Palomo, J.M. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality / J.M. Palomo, M. Fuentes, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // *Biomacromolecules.* — 2003. — V. 4 (1). — P. 1—6.
55. Subinya, M. Conformation and activity of lipase B from *Candida antarctica* in biocontinuous microemulsions / M. Subinya, A.K. Steudle, T.P. Jurkowski, C. Stubenrauch // *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* — 2015. — V. 131. — P. 108—114.
56. Ottosson, J. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity / J. Ottosson, L. Fransson, J. W. King, K. Hult // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2002. — V. 1594 (2). — P. 325—334.
57. Torres-Gavilan, A. The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates / A. Torres-Gavilan, E. Castillo, A. Lopez-Munguа // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2006. — V. 41. — P. 136—140.
58. Miyazawa, T. Highly regioselective propanoylation of dihydroxybenzenes mediated by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents / T. Miyazawa, M. Hamada, R. Morimoto, T. Murashima, T. Yamada // *Tetrahedron Lett.* — 2008. — V. 49. — P. 175—178.
59. Hedfors, C. Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction / C. Hedfors, K. Hult, M. Martinelle // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2010. — V. 66. — P. 120—123.
60. Tsai, S.-W. Enantiopreference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2014. — In Press, Corrected Proof, Available online — <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.07.010>
61. Miyazawa, T. *Candida antarctica* lipase B-mediated regioselective acylation of dihydroxybenzenes in organic solvents / T. Miyazawa, M. Hamada, R. Morimoto, Y. Maeda // *Tetrahedron.* — 2015. — V. 71. — P. 3915—3923.
62. Pawar, S.V. Kinetics and mechanism of regioselective monoacetylation of 3-aryloxy-1,2-propanediols using immobilized *Candida antarctica* lipase / S.V. Pawar, G.D. Yadav // *J. Ind. Eng. Chem.* — 2015. — V. 31. — P. 335—342.
63. Rangel, H. Structural features of N-benzylated-b-amino acid methyl esters essential for enantiodifferentiation by lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic reactions / H. Rangel, M. Carrillo-Morales, J.M. Galindo, E. Castillo, A. Obregon-Zuniga, E. Juaristi, J. Escalante // *Tetrahedron: Asymm.* — 2015. — V. 26. — P. 325—332.
64. Rotticci, D. Improved Enantioselectivity of a Lipase by Rational Protein Engineering / D. Rotticci, C. Johanna, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult // *CemBioChem.* — 2001. — V.2. — P.766—770.
65. Joubioux, F.L. The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by the solvents in acylation reactions of amino-alcohols / F.L. Joubioux, N. Bridiau, Y.B. Henda, O. Achour, M. Graber, T. Maugard // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2013. — V. 95. — P. 99—110.
66. Joubioux, F.L. The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols / F.L. Joubioux, Y.B. Henda, N. Bridiau, O. Achour, M. Graber, T. Maugard // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2013. — V. 85—86. — P. 193—199.
67. Ferrari, F. Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions / F. Ferrari, C. Paris, B. Maigret, C. Bidouil, S. Delaunay, C. Humeau, I. Chevalot // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2014. — V.101. — P.122—132.
68. Hoegh, I. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae* / I. Hoegh, S. Patkar, T. Halkier, M.T. Hansen // *Canada J. Bot.* — 1995. — V. 73. — P. 869—875.
69. Zhang, N.Y. Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through direct evolution / N.Y. Zhang, W.C. Suen, W. Windzor, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks // *Protein Eng.* — 2003. — V. 16. — P.599—605.
70. Liu, D. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm — a screening system for a frequently used biocatalyst / D. Liu, R.D. Schmid, M. Rusnak // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — V. 72. — P.1024—1032.

71. Ujii, A. Extracellular production of *Pseudozyma (Candida) antarctica* lipase B with genuine primary sequence in recombinant *Escherichia coli* / A. Ujii, H. Nakano, Y. Iwasaki // J. Biosci. Bioeng. — 2016. — V. 121 (3). — P. 303—309.
72. Emond, S. New efficient recombinant expression system to engineer *Candida antarctica* lipase B / S. Emond, C. Montanier, J.-M. Nicaud, A. Marty, P. Monsan, I. Andre, M. Remaud-Simeon // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — V. 76. — P. 2684—2687.
73. Larsen, M.W. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems / M.W. Larsen, U.T. Bornscheuer, K. Hult // Protein Expr. Purif. — 2008. — V. 62. — P. 90—97.
74. Vadhana, A.K.P. Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris* / A.K.P. Vadhana, P. Samuel, R.M. Berin, J. Krishna, K. Kamatchi, S. Meenakshisundaram // Enz. Microb. Technol. — 2013. — V. 52. — P. 177—183.
75. Wen, H.J. Enantioselective synthesis of (1S,4R)-N-(benzyl-carbamoyl)-4-aminocyclopent-2-en-1-ol by *Candida antarctica* lipase B / H.J. Wen, Q. Chen, G.J. Zheng // Chinese Chem. Lett. — 2015. — V. 26. — P. 1431—1434.
76. Liu, Z.-Q. Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters / Z.-Q. Liu, X.-B. Zheng, S.-P. Zhang, Y.-G. Zheng // Microbiol. Res. — 2012. — V. 167. — P. 452—460.
77. Eom, G.T. High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* / G.T. Eom, S.H. Lee, B.K. Song, K.-W. Chung, K. Young-Wun, J.K. Song // J. Biosci. Bioeng. — 2013. — V. 116 (2). — P. 165—170.
78. Rotticci-Mulder, J.C. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase B Fused to a Cellulose-Binding Domain / J.C. Rotticci-Mulder, M. Gustavsson, M. Holmquist, K. Hult, M. Martinelle // Protein Expr. Purif. — 2001. — V. 21. — P. 386—392.
79. Branneby, C. Carbon-Carbon Bonds by Hydrolytic Enzymes / C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund // J. Am. Chem. Soc. — 2003. — V. 125. — P. 874—875.
80. Svedendahl, M. Fast Carbon-Carbon Bond Formation by a Promiscuous Lipase / M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund // J. Am. Chem. Soc. — 2005. — V. 127. — P. 17988—17989.
81. Qian, Z. Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation / Z. Qian, S. Lutz // J. Am. Chem. Soc. — 2005. — V. 127. — P. 13466—13467.
82. Park, H.J. Prediction of the solvent affecting site and the computational design of stable *Candida antarctica* lipase B in a hydrophilic organic solvent / H.J. Park, J.C. Joo, K. Park, Y.H. Kim, Y.J. Yoo // J. Biotechnol. — 2013. — V. 163. — P. 346—352.
83. Park, H.J. Computational approach for designing thermostable *Candida antarctica* lipase B by molecular dynamics simulation / H.J. Park, K. Park, Y.H. Kim, Y.J. Yoo // J. Biotechnol. — 2014. — V. 192, Part A. — P. 66—70.
84. Mateo, C.J. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques / C.J. Mateo, M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // Enz. Microb. Technol. — 2007. — V. 40. — P. 1451—1463.
85. Hanefeld, U. Understanding enzyme immobilisation / U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner // Chem. Soc. Rev. — 2009. — V. 38. — P. 453—468.
86. Illanes, A. Immobilized Biocatalysts: Comprehensive Biotechnology. V. 1. (2<sup>nd</sup> ed.). [Ed. Murray Moo-Young]. — Amsterdam: Elsevier, 2011. — P. 25—39.
87. Datta, S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials / S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram // 3 Biotech. — 2012. — V. 3. — P. 1—9.
88. Sheldon, R.A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance // Adv. Synth. Catal. — 2007. — V. 349(8—9). — P. 1289—1307.
89. Brady, D. Advances in enzyme immobilization / D. Brady, J. Jordaan // Biotechnol. Lett. — 2009. — V. 31. — P. 1639—1650.
90. Abedi, D., Zhang, L., Pyne, M., Chou, C.P. Enzyme Biocatalysis: Comprehensive Biotech. V. 1. (2<sup>nd</sup> ed.). [Ed. Murray Moo-Young]. — Amsterdam: Elsevier, 2011. — P. 15—24.
91. Cao, L. Immobilized enzymes: Comprehensive Biotechnology. V. 2. (2<sup>nd</sup> ed.) [Ed. Murray Moo-Young]. — Amsterdam: Elsevier, 2011. — P. 461—476.
92. Garcia-Galan, C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance / C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues // Adv. Synth. Catal. — 2011. — V. 353. — P. 2885—2904.
93. Illanes, A. Recent trends in biocatalysis engineering / A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson, G.R. Castro // Biores. Technol. — 2012. — V. 115. — P. 48—57.
94. Lee, K.W. Development of an amphiphilic matrix for immobilization of *Candida antarctica* lipase B for biodiesel production / K.W. Lee, K. Min, K. Park, Y.J. Yoo // Biotechnol. Bioproc. Eng. — 2010. — V. 15. — P. 603—607.
95. Severac, E. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact / E. Severac, O. Galya, F. Turon, C.A. Pantel, J.-S. Condoret, P. Monsan, A. Marty // Enz. Microb. Technol. — 2011. — V. 48. — P. 61—70.
96. Cruz, J. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking / J. Cruz, O. Barbosa, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, R. Torres, C. Ortiz // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2012. — V. 80. — P. 7—14.
97. Galvis, M. Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates / M. Galvis, O. Barbosa, M. Ruiz, J. Cruz, C. Ortiz, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente // Proc. Biochem. — 2012. — V. 47. — P. 2373—2378.
98. Palomo, J. M. Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques // Curr. Bioact. Compounds. — 2008. — V. 4. — P. 126—138.

99. Palomo, J.M. Modulation of Enzymes Selectivity via Immobilization // *Curr. Org. Synth.* — 2009. — V. 6. — P. 1—14.
100. Idris, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis / A. Idris, A. Bukhari // *Biotechnol. Adv.* — 2012. — V. 30. — P. 550—563.
101. Palomo, J.M. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of ( $\pm$ )- $\alpha$ -hydroxy-phenylacetic acid derivatives / J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, M. Fuentes, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan // *Tetrahedron: Asymm.* — 2002. — V. 13. — P. 1337—1345.
102. Palomo, J.M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters / J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan // *Enz. Microb. Technol.* — 2002. — V. 31. — P. 775—783.
103. Palomo, J.M. Unusual enzymatic resolution of ( $\pm$ )-glycidyl-butyrates for the production of (*S*)-glycidyl derivatives / J.M. Palomo, R.L. Segura, M. Fuentes, C.C. Ortiz, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // *Enz. Microb. Technol.* — 2006. — V. 38. — P. 429—435.
104. Palomo, J.M. Regioselective Hydrolysis of Different Peracetylated  $\beta$ -Monosaccharides by Immobilized Lipases from Different Sources. Key Role of The Immobilization / J.M. Palomo, M. Filice, R. Fernandez-Lafuente, M. Terreni, J.M. Guisan // *Adv. Synth. Catal.* — 2007. — V. 349. — P. 1969—1976.
105. Boros, Z. How the mode of *Candida antarctica* lipase B immobilization affects the continuous-flow kinetic resolution of racemic amines at various temperatures / Z. Boros, P. Falus, M. Markus, D. Weiser, M. Olah, G. Hornyanszky, J. Nagy, L. Poppe // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2013. — V. 85—86. — P. 119—125.
106. Basso, A. In Silico Analysis of Enzyme Surface and Glycosylation Effect as a Tool for Efficient Covalent Immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads® / A. Basso, P. Braiucă, S. Cantone, C. Ebert, P. Paolo Linda, P. Spizzo, P. Caimi, U. Hanefeld, G. Giuliano Degrossi, L. Gardossi // *Adv. Synth. Catal.* — 2007. — V. 349. — P. 877—886.
107. Li, Y. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization / Y. Li, F. Gao, W. Wei, J.B. Qu, G.H. Ma, W.Q. Zhou // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2010. — V. 66. — P. 182—189.
108. Blanco, R.M. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts / R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernandez-Perez, C. Otero, G. Diaz-Gonzalez // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2004. — V. 30 (2). — P. 83—93.
109. Blanco, R.M. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support / R.M. Blanco, P. Terreros, N. Munoz, E. Serra // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2007. — V. 47. — N (1—2). — P. 13—20.
110. Forde, J. Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates / J. Forde, A. Vakurov, T.D. Gibson, P. Millner, M. Whelehan, I.W. Marison, C. O'Fagain // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2010. — V. 66 (1/2). — P. 203—209.
111. Poppe, J.K. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction / J.K. Poppe, A.P.O. Costa, M.C. Brasil, R.C. Rodrigues, M.A.Z. Ayub // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2013. — V. 94. — P. 57—62.
112. Bosley, J.A. Blue print for a lipase support use of hydrophobic controlled pore glasses as model systems / J.A. Bosley, J.C. Clayton // *Biotechnol. Bioeng.* — 1994. — V. 43 (10). — P. 934—938.
113. Tufvesson, P. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals / P. Tufvesson, U. Tornvall, J. Carvalho, A.J. Karlsson, R. Hatti-Kaul // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* — 2011. — V. 68. — P. 200—205.
114. Basso, A. New highly robust divinyl benzene/acrylate polymer for immobilization of lipase CALB / A. Basso, L. Froment, M. Hessler, S. Serban // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* — 2013. — V. 115. — P. 468—472.
115. Friedrich, J.L.R. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* / J.L.R. Friedrich, F.P. Pena, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* — 2013. — V. 88. — P. 1089—1095.
116. Palomo, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl—Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases / J.M. Palomo, G. Munoz, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan // *J. Mol. Catal. B: Enz.* — 2002. — V. 19—20. — P. 279—286.
117. Petkar, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis / M. Petkar, A. Lali, P. Caimi, M. Daminati // *J. Mol. Catal. B: Enz.* — 2006. — V. 39. — P. 83—90.
118. Sun, J.N. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium / J.N. Sun, Y.J. Jing, L.Y. Zhou, J. Gao // *New Biotechnol.* — 2010. — V. 27. — P. 53—58.
119. Nakaoki, T. *Candida antarctica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: effects of immobilization matrices on polymerization kinetics & molecular weight / T. Nakaoki, Y. Mei, L.M. Miller, A. Kumar, B. Kalra, M.E. Miller // *Ind. Biotechnol.* — 2005. — V. 1 (2). — P. 126—134.
120. Hernandez, K. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads / K. Hernandez, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente // *Enz. Microb. Technol.* — 2011. — V. 49. — P. 72—78.
121. Veum, L. Optimisation of the Enantioselective Synthesis of Cyanohydrin Esters / L. Veum, L.T. Kanerva, P.J. Halling, T. Maschmeyer, U. Hanefeld // *Adv. Synth. Catal.* — 2005. — V. 347. — P. 1015—1021.
122. Serra, E. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of Textural and structural parameters / E. Serra, A. Mayoral, Y. Sakamoto, R.M. Blanco, I. Diraz // *Micropor. Mesopor. Mat.* — 2008. — V. 14. — P. 201—213.

123. Jun, C. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification / C. Jun, B.W. Jeon, J.C. Joo, Q.A.T. Le, S.-A. Gu, S. Byun, D.H. Cho, D. Kim, B.-I. Sang, Y.H. Kim // Proc. Biochem. — 2013. — V. 48. — P.1181—1187.
124. Wang, W. Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres / W. Wang, W. Zhou, J. Li, D. Hao, Z. Su, G. Ma // Bioproc. Biosyst. Eng. — 2015. — V. 38. — P. 2107—2115.
125. Barbosa, O. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* / O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente // Proc. Biochem. — 2012. — V. 47. — P. 1220—1227.
126. Chen, B. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis / B. Chen, J. Hu, E.M. Miller, W. Xie, M. Cai, R.A. Gross // Biomacromolecules. — 2008. — V. 9. — P. 463—471.
127. Cipolatti, E.P. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization / E.P. Cipolatti, A. Valerio, G. Nicoletti, E. Theilacker, P.H.H. Araujo, C. Sayer, J.L. Ninow, D. de Oliveira // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2014. — V.109. — P. 116—121.
128. Santin, C. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam / C. Santin, R. Scherer, N. Nyari, C. Rosa, R. Dallago, D. Oliveira, V. Oliveira // Biocatal. Agric. Biotechnol. — 2014. — V. 3. — P. 90—94.
129. Raghavendra, T. Robust nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B — Multiwalled carbon nanotubes: Characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis / T. Raghavendra, A. Basak, L.M. Manocha, A.R. Shah, D. Madamwar // Biores. Technol. — 2013. — V. 140. — P. 103—110.
130. Prabhavathi Devi, B.L.A. Characterization of Cross-Linked Lipase Aggregates / B.L.A. Prabhavathi Devi, Z. Guo, X. Xu // J. Am. Oil Chem. Soc. — 2009. — V. 86. — P. 637—642.
131. Talbert, J.N. Enzymes on material surfaces / J.N. Talbert, J.M. Goddard // Colloids Surfaces B: Biointerfaces. — 2012. — V. 93. — P. 8—19.
132. Peng, Y. Effect of support surface chemistry on lipase adsorption and activity / Y. Peng, H. Zhu-Ping, X. Yong-Juan, H. Peng-Cheng, T. Ji-Jun // J. Mol. Catal. B: Enz. — 2013. — V. 94. — P. 69—76.
133. Truppo, M.D. Development of an improved immobilized CAL-B for the enzymatic resolution of a key intermediate to odanacatib / M.D. Truppo, G. Hughes // Org. Proc. Res. Dev. — 2011. — V. 15. — P. 1033—1035.
134. Graebin, N.G. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene—divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis / N.G. Graebin, A.B. Martins, A.S.G. Lorenzoni, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues // Biotechnol. Prog. — 2012. — V. 28. — P. 406—412.
135. Poppe, J.K. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports / J.K. Poppe, C. Garcia-Galan, C.R. Matte, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, M.A.Z. Ayub // J. Mol. Catal. B: Enz. — 2013. — V. 94. — P. 51—56.
136. Laszlo, J.A. Active-site titration analysis of surface influences on immobilized *Candida antarctica* lipase B activity / J.A. Laszlo, M. Jackson, R.M. Blanco // J. Mol. Catal. B: Enz. — 2011. — V.69. — P. 60—65.
137. Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports / R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan // ChemPhysLipids. — 1998. — V. 93. — P.185—197.
138. Bastida, A. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports / A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, J. Huguet, J.M. Guisan // Biotechnol. Bioeng. — 1998. — V. 58. — P. 486—493.
139. Fernandez-Lorente, G. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties / G. Fernandez-Lorente, Z. Cabrera, C. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, J.M. Guisan // Proc. Biochem. — 2008. — V.43. — P.1061—1067.
140. Palomo, J.M. Enzymatic resolution of ( $\pm$ )-*trans*-4-(4-fluorophenyl)-6-oxopiperidin-3-ethyl carboxylate, intermediate in synthesis of (—)-Paroxetine / J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente // Tetrahedron: Asymm. — 2002. — V. 13. — P. 2375—2381.
141. Hernandez, K. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide / K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente // Proc. Biochem. — 2011. — V. 46. — P. 873—878.
142. Hernandez, K. Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield / K. Hernandez, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente // Enz. Microb. Technol. — 2011. — V. 48. — P. 510—517.
143. Gupta, N. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix / N. Gupta, P. Rath, R. Singh, V.K. Goswami, R. Gupta // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — V. 67 (5). — P. 648—653.
144. Popat, A. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers / A. Popat, S.B. Hartono, F. Stahr, J. Liu, S.Z. Qiao, G.Q. Lu // Nanoscale. — 2011. — V.3(7). — P. 2801—2818.
145. Veum, L. Enantioselective formation of mandelonitrile acetate: investigation of a dynamic kinetic resolution / L. Veum, U. Hanefeld // Tetrahedron: Asymm. — 2004. — V. 15. — P. 3707—3709.
146. Heinsman, N.W.J.T. Substrate sorption into the polymer matrix of Novozym 435® and its effect on the enantiomeric ratio determination / N.W.J.T. Heinsman, C.G.P.H. Schroyen, A. van der Padt, M.C. Franssen, R.R.M. Boom, K. van't Riet // Tetrahedron: Asymm. — 2003. — V. 14. — P. 2699—2704.

147. Xu, Y. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor / Y. Xu, W. Du, D. Liu // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2005. — V. 32. — P. 241—245.
148. Wang, J. Lipase-catalyzed synthesis of MPEG methyl acrylates in solvent-free system / J. Wang, H. Ying, J. Ma, X. Cao, K. Chen, J. Ge, O. Pingkai // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2015. — V. 122. — P. 305—313.
149. Nieguth, R. Enabling industrial biocatalytic processes by application of silicone-coated enzyme preparations / R. Nieguth, M. Eckstein, L.O. Wiemann, O. Thum, M.B. Ansorge-Schumacher // Adv. Synth. Catal. — 2011. — V. 353. — P. 2522—2528.
150. Zhao, H. Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids / H. Zhao, Z. Song // Biochem. Eng. J. — 2010. — V. 49. — P. 113—118.
151. Toledo, M.V. Towards a green enantiomeric esterification of R/S-ketoprofen: A theoretical and experimental investigation / M.V. Toledo, C. Jose, S.E. Collins, M.L. Ferreira, L.E. Briand // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2015. — V. 118. — P. 52—61.
152. Barbosa, O. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde / O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente // Proc. Biochem. — 2012. — V. 47. — P. 766—774.
153. Wang, W. Comparison of the Properties of Lipase Immobilized onto Mesoporous Resins by Different Methods / W. Wang, Y. Jiang, L. Zhou, J. Gao // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2011. — V. 164. — P. 561—572.
154. Saez, R.T. Chemical modification of lipase B from *Candida antarctica* for improving biochemical properties of activity, stability and selectivity / R.T. Saez, C.O. Lopez, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente // New Biotechnol. — 2014. — V. 31. — P. 85.
155. Wiemann, L.O. Ansorge-Schumacher M.B. Composite particles of Novozyme 435 and silicone: Advancing technical applicability of macroporous enzyme carriers / L.O. Wiemann, R. Nieguth, M. Eckstein, M. Naumann, O. Thum // ChemCatChem. — 2009. — V. 1. — P. 455—462.
156. Fernandez-Lorente, G. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance / G. Fernandez-Lorente, J.M. Palomo, C. Mateo, R. Munilla, C. Ortiz, Z. Cabrera, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente // Biomacromolecules. — 2006. — V. 7. — P. 2610—2615.
157. Fernandez-Lorente, G. Improved Catalytic Properties of Immobilized Lipases by the Presence of Very Low Concentrations of Detergents in the Reaction Medium / G. Fernandez-Lorente, J.M. Palomo, Z. Cabrera, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan // Biotechnol. Bioeng. — 2007. — V. 97 (2). — P. 242—250.
158. Barbosa, O. Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports / O. Barbosa, Ruiz, C. Ortiz, M. Fernandez, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente // Proc. Biochem. — 2012. — V. 47. — P. 867—876.
159. Cao, L. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? / L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon // Curr. Opin. Biotech. — 2003. — V. 14. — P. 387—394.
160. Schoevaart, R. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) / R. Schoevaart, M.W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A.P.G. Kieboom, F. Van Rantwijk // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — V. 87. — P. 754—762.
161. Sheldon, R.A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts // Org. Proc. Res. Develop. — 2011. — V. 15. — P. 213—223.
162. Gupta, N., Raghava, S. Enzyme Stabilization via Cross-Linked Enzyme Aggregates: Enzyme Stabilization and Immobilization Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. V. 679. [Ed. S.D. Minter]. — New York City: Humana Press, 2011. — P. 133—145.
163. Lopez-Serrano, P. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases / P. Lopez-Serrano, L. Cao, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon // Biotechnol. Lett. — 2002. — V. 24. — P. 1379—1383.
164. Kapoor, M. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B / M. Kapoor, M.N. Gupta // Proc. Biochem. — 2012. — V. 47 (3). — P. 503—508.
165. Schoevaart, R. Glutaraldehyde Cross-link Analogues from Carbohydrates / R. Schoevaart, A. Siebum, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon // Starch/Storke. — 2005. — V. 57. — P. 161—165.
166. Matsuda, T. Rate Enhancement of Lipase-catalyzed Reaction in Supercritical Carbon Dioxide / T. Matsuda, K. Tsuji, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, T. Ikariya // Chem. Lett. — 2005. — V. 34. — P. 1102—1103.
167. Cipolatti, E.P. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization / E.P. Cipolatti, M.J.A. Silva, M. Klein, V. Feddern, M.M.C. Feltes, D. de Oliveira, A. Valerio, J.L. Ninow // J. Mol. Catal. B: Enzym. — 2014. — V. 99. — P. 56—67.
168. Cruz, J.C. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica / J.C. Cruz, P.H. Pfromm, M.E. Rezac // Proc. Biochem. — 2009. — V. 44. — P. 62—69.
169. Kramer, M. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica / M. Kramer, J.C. Cruz, P.H. Pfromm, M.E. Rezac, P. Czermak // J. Biotechnol. — 2010. — V. 150. — P. 80—86.

A.V. SKLYARENKO<sup>1,\*</sup>, N.V. MEDVEDEVA<sup>1</sup>,  
A.I. SIDORENKO<sup>1</sup>, YIJUN HUANG<sup>2</sup>, FULI LI<sup>3</sup>,  
and S.V. YAROTSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The State Research institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

<sup>2</sup>Qingdao Vland Biotech Inc., China

<sup>3</sup>Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Acad. Sci., China

*e-mail:* asklyarenko@yandex.ru

## Technological Biocatalysts based on Lipase from *Candida antarctica* and their Use

The review paper concerns the problem of the design and practical application of technological biocatalysts based on lipase

fraction B from *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CALB). CALB occupies an intermediate position between esterases and true interface-activated lipases that ensures its unique properties. Wide specificity in the synthesis/hydrolysis of a broad range of esters, amides and thiols characteristic of esterases is combined in this enzyme with the inherent to lipases possibility of working on oil-water interface of emulsified substrates and in the medium of organic solvents, along with high regio- and enantioselectivity, high thermostability and tolerance to the presence of polar and non-polar solvents. The known approaches to the immobilization of CALB are discussed in terms of structure and properties of the enzyme, and the purpose of the resulting biocatalyst. The reported data on the possibilities of practical implementation of CALB biocatalysts are summarized.

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

*Biotechnologiya (Biotechnology)*, V. 32, N 3, P. 10—56.

---

\* Author for correspondence.