



УДК 577.152.311\*3.03

## СООСАЖДЕНИЕ ЛИПАЗЫ *Pseudomonas fluorescens* С ГИДРОФОБНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ КАК ПОДХОД К ЕЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРИ КАТАЛИЗЕ В НЕВОДНЫХ СРЕДАХ

© 2002 г. И. В. Горохова<sup>#</sup>, А. Е. Иванов, В. П. ЗубовИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.11.2000 г. Принята к печати 11.03.2001 г.

Присутствие липазы *Pseudomonas fluorescens* при осаждении *N*-цетиламина, *N*-цетилацетамида, 1,2-гексадекандиола, цетилового спирта и полибутилметакрилата в водно-ацетоновой среде приводит к ее копреципитации. В составе лиофилизированных копреципитатов липаза проявляет высокую каталитическую активность и стереоселективность в реакции ацетилирования (1*RS*)-фенилэтанола винилацетатом в *трет*-бутилметилом эфире, причем липазная активность копреципитатов возрастает в ряду соосаждителей: цетиловый спирт, полибутилметакрилат, 1,2-гексадекандиол, *N*-цетил-амин, *N*-цетилацетамид и превосходит активность исходного фермента в 2.5–19 раз. Найдено, что иммобилизация липазы в присутствии гексадекандиола на твердых носителях Celite 545 (физическая сорбция) и Eupergit C250L (ковалентное связывание) позволяет увеличить активность иммобилизованного фермента в реакции этерификации.

*Ключевые слова:* липаза; 1,2-гексадекандиол; цетиловый спирт; полибутилметакрилат; *N*-цетил-амин; *N*-цетилацетамид; иммобилизация; синтез сложных эфиров.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы энантиоселективный синтез органических соединений, катализируемый ферментами, – интенсивно развивающаяся отрасль биоорганической и органической химии. Это обусловлено необходимостью получения широкого спектра хиральных органических соединений с высокой степенью оптической чистоты. К таким соединениям относятся, в частности, некоторые лекарства и их составляющие, а также различные биохимические реагенты. В ряду гидролитических ферментов, используемых как катализаторы органо-химических превращений, липазы (КФ 3.1.1.3) занимают особое место ввиду возможности их использования как в реакциях гидролиза липидов и сложных эфиров, так и в реакциях энантиоселективной этерификации и переэтерификации в органических растворителях или в водно-органических системах [1–7]. Такие факторы, как строгая стереоспецифичность и высокая скорость ферментативных реакций, и, кроме того, возможность их проведения в мягких условиях способствуют использованию липаз в промышленности. Однако, с экономической точки зрения, в промышленных

масштабах желательнее применение иммобилизованных ферментов, что облегчает их выведение из реакционной системы и повторное использование.

В связи с этим в настоящее время интенсивно изучаются различные методы иммобилизации липаз: физическая сорбция на гидрофобных адсорбентах [8–10], включение в гидрофобные гели [11], а также включение в гидрофобные копреципитаты [12] и обработка фермента синтетическими липидоподобными реагентами [13]. Различные методы иммобилизации дают возможность получать катализаторы с широко варьируемыми свойствами. Согласно работе [10], для препаратов липазы, иммобилизованной на ряде твердых носителей, самая высокая начальная скорость этерификации спирта в модельной реакции наблюдалась при использовании для адсорбции частиц Celite 545 (в 6–7 раз выше по сравнению с неиммобилизованным ферментом), а операционная стабильность (активность препарата после 10 циклов работы) была выше в случае ковалентного связывания белка с носителем Eupergit C250L.

Ранее нами было показано, что при включении липаз в гидрофобные копреципитаты с 1,2-гексадекандиолом (HDD) [12] значительно (более чем в 10 раз) увеличивается каталитическая активность фермента в реакции энантиоселективной этерификации. Выраженное увеличение активности фермента наблюдается также и при его обработке липидоподобными реагентами [13], од-

Сокращения: HDD – 1,2-гексадекандиол; СеАА – *N*-цетилацетамид; СеОН – цетиловый спирт; СеNH<sub>2</sub> – *N*-цетил-амин; РВМА – полибутилметакрилат; ТВМЕ – *трет*-бутилметилом эфир.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00; эл. почта: irinagorokhova@ibch.ru).

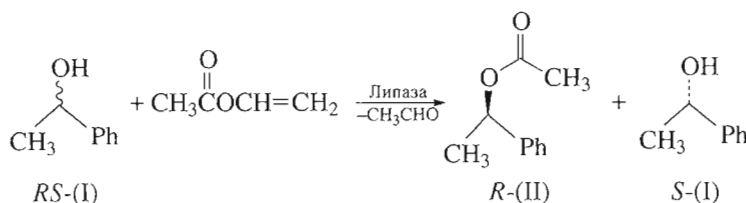


Схема ферментативной этерификации (1*RS*)-фенилэтанола винилацетатом.

нако, указанные методы иммобилизации пока исследованы слабо. В связи с этим представляет интерес изучение в качестве соосаждителей веществ, близких по строению к HDD, а также некоторых полимеров со сходными растворимостью и балансом гидрофильно-гидрофобных свойств.

В данной работе мы изучили включение липазы в копреципитаты с рядом гидрофобных веществ, разработали подходы к получению регенерируемых катализаторов на основе твердых частиц Celite 545 и Eupergit C250L и предложили измененную методику измерения скорости модельной реакции (энантиоселективное ацетилирование (1*RS*)-фенилэтанола (*RS*-(I)) винилацетатом в среде ТВМЕ (схема)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Определение состава реакционной смеси в модельной реакции

Выделение в чистом виде продукта реакции ферментативного ацетилирования – (1*R*)-фенилэтилацетата (*R*-(II)) (схема) осуществляли с помощью ВЭЖХ вместо использованной ранее газовой хроматографии [10]. В стандартных условиях офВЭЖХ при элюции в изократической системе (вода–ацетонитрил, 1 : 1) на носителе с октадецильными группами прочнее удерживается вещество, гидрофобность которого выше. Поскольку гидрофобность увеличивается в ряду (I), винилацетат, (II), соответственно увеличивается и время удерживания этих соединений на колонке: 5.9, 6.2 и 13.5 мин (рис. 1). Содержание продукта (II) в реакционной смеси определяли по площади хроматографического пика в координатах оптическая плотность–время с учетом известного молярного коэффициента поглощения  $\epsilon_{260}$  80 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Сопоставление результатов по содержанию (II), зарегистрированному изложенным методом и с помощью газовой хроматографии, показало, что различия не превышают 3%.

### Получение и свойства копреципитатов липазы с гидрофобными соединениями

Копреципитаты липазы с гидрофобными веществами получали аналогично описанному ранее получению копреципитата липазы с HDD [12]. Бы-

ли использованы соосаждители липазы с одинаковой длиной гидрофобного радикала – C<sub>16</sub>, но различающиеся концевой функциональной группой, а также РВМА. Содержание фермента в копреци-

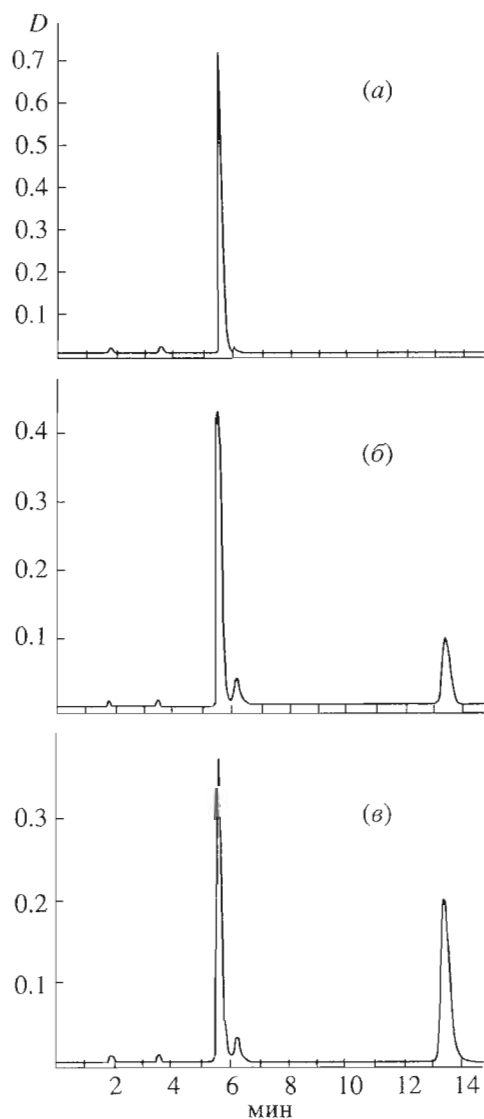


Рис. 1. Анализ методом офВЭЖХ реакционной смеси при реакции энантиоселективного ацетилирования (1*RS*)-фенилэтанола винилацетатом, катализируемой нативной липазой. Время реакции: 0 (а), 24 (б) и 97 ч (в); конверсия (1*RS*)-фенилэтанола 25 (б) и 50% (в).

**Таблица 1.** Ферментативная активность исходной липазы и ее копреципитатов

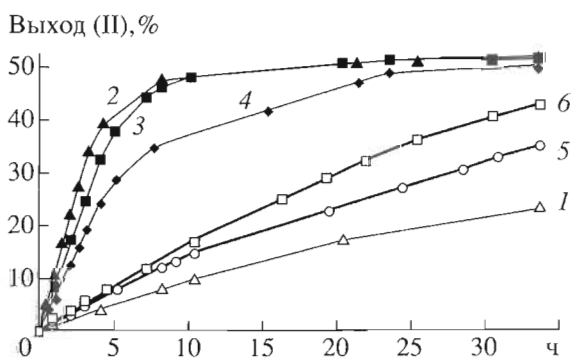
Соосади- тель липазы	Включение фермента в копреципи- тат, %	Активность*	
		при гидролизе триацетина	при ацетили- ровании (1 <i>RS</i> )-фенил- этанола
–	–	435	1530
CeAA	65	200	19000
CeNH <sub>2</sub>	99	250	13600
HDD	85	490	9300
CeOH	80	150	2500
PBMA	90	46	2900

\* В мкмоль продукта ч<sup>-1</sup> (мг фермента)<sup>-1</sup>.

питатах рассчитывали по остаточной гидролитической активности его в супернатанте:

$$\text{включение фермента в преципитат (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{активность липазы в супернатанте}}{\text{исходная активность липазы}} \right) \times 100.$$

Так, максимальное включение фермента (более 99%) в копреципитаты было обнаружено при осаждении CeNH<sub>2</sub> (табл. 1). Этот эффект можно объяснить вкладом электростатического взаимодействия между положительно заряженными частицами CeNH<sub>2</sub> и отрицательно заряженными молекулами липазы. Эффективность включения липазы в копреципитаты убывает в ряду соосади-  
телей CeNH<sub>2</sub> – PBMA – HDD – CeOH – CeAA. Однако в случае CeOH в супернатанте обнаруживаются очень мелкие частицы копреципитата, которые не седиментируют при используемых условиях его выделения, поэтому содержание белка в копреципитате (80%) является лишь ориентировочным.



**Рис. 2.** Кинетические кривые накопления 1-фенилэтилацетата в модельной реакции этерификации при катализе исходной липазой (1) и липазой, иммобилизованной в копреципитатах с CeAA (2), CeNH<sub>2</sub> (3), HDD (4), CeOH (5), PBMA (6). Количество липазы 0.03 мг.

Другая закономерность наблюдается при определении каталитической активности копреципитатов в реакции гидролиза триацетина (табл. 1). Гидролитическая активность липазы в копреципитатах сохраняется не полностью и убывает в ряду соосади-  
телей HDD – CeNH<sub>2</sub> – CeAA – CeOH – PBMA. Только в копреципитате с HDD наблюдается некоторая активация (в 1.13 раза) липазы. Ранее в литературе отмечалась стабилизация липаз под действием *цис*-диолов (например, сорбита) [14]. Возможно, в этом причина высокого сохранения активности фермента и в копреципитатах с HDD.

Наиболее интересные результаты были получены при определении активности вышеуказанных копреципитатов в модельной реакции этерификации в органическом растворителе (рис. 2). При катализе реакции ацетилирования *RS*-(I) винилацетатом с помощью различных копреципитатов липазы во всех случаях наблюдалась активация по сравнению с действием нативного фермента (табл. 1). Этерификационная активность копреципитатов фермента уменьшается в ряду соосади-  
телей CeAA – CeNH<sub>2</sub> – HDD – PBMA – CeOH. Нетрудно заметить (табл. 1), что катализаторы, активные в органическом растворителе, не столь активны в водной среде. Причина может быть связана с различной смачиваемостью копреципитатов, а также с различиями в их структурной организации, влияющей на транспорт субстратов к активным центрам липазы. Вместе с тем значительные различия активности копреципитатов в реакции этерификации заставляют предположить более или менее специфическое связывание между ферментом и соосади-  
телями. Учитывая то, что длины гидрофобных радикалов соосади-  
телей одинаковы или очень близки (кроме PBMA), можно предположить, что указанное связывание определяется полярными взаимодействиями (электростатические, водородные связи) с соосади-  
телями, дающими наиболее активные копреципитаты (CeAA и CeNH<sub>2</sub>). Нужно отметить, что все полученные копреципитаты можно выделять из реакционной смеси, а значит, есть принципиальная возможность их повторного использования, что важно для практического применения. В этом плане наиболее обещающим соосади-  
телем является PBMA (его копреципитаты с липазой легче всего выделить как из водной среды, так и из TBME). Таким образом, применение соосади-  
телей полимеров могло бы открыть новые пути получения регенерируемых катализаторов. Помимо высокой каталитической активности одним из достоинств полученных копреципитатов является дешевизна исходных материалов, что выгодно отличает их от ранее использованных труднополу-  
чаемых липидоподобных реагентов [13].

**Энантионаправленность реакции этерификации**

Исследование оптической активности образцов 1-фенилэтилацетата, полученных в результате реакций, катализируемых нативной липазой и ее копреципитатами, свидетельствуют о сохранении энантионаправленности реакции этерификации (табл. 2). Удельное вращение для всех копреципитатов имеет один и тот же знак и находится в одном интервале значений (70–80°). Различия величин угла вращения в данном случае связаны с выделением продукта при разных степенях превращения *RS*-(I) в *R*-(II). Так как наряду с ацетилированием *R*-формы спирта медленно протекает ацетилирование его *S*-формы, то со временем, при увеличении степени превращения *RS*-(I), оптическое вращение продукта уменьшается, что наглядно наблюдается при сравнении опытов с нативной липазой и с копреципитатом липазы с СеОН (табл. 2). Энантиомерная чистота (*e.e.*) *R*-(II) более 99% наблюдалась ранее в случае катализа нативной липазой при конверсии *RS*-(I), равной 48% [7]. Исходя из представленных выше данных можно заключить, что при использовании копреципитатов липазы как катализаторов в модельной реакции *e.e.* продукта остается высокой.

**Иммобилизация липазы на твердых носителях**

Несмотря на возможность использования копреципитатов липазы с гидрофобными соосаждителями в виде высокоактивных и стереоселективных катализаторов ацетилирования в неводной среде, иммобилизация фермента на твердых носителях остается более перспективной по причине механической стабильности получаемых катализаторов. В связи с этим представляет интерес изучение иммобилизации липазы на твердых носителях в присутствии описанных выше гидрофобных соосаждителей как попытки получения высокоактивных и, одновременно, механически прочных катализаторов. Для этого нами были выбраны два принципиально различных метода: физическая сорбция липазы на цеолитном носителе Celite 545 и ковалентное связывание белка с коммерческим полиметакриловым носителем с эпоксидными группами Eupergit C250L в присутствии гидрофобных соосаждителей, которые показали высокую каталитическую активность (табл. 3, рис. 3).

При ковалентном связывании фермента на носителе Eupergit C250L наблюдается сохранение 74% этерификационной активности, в то время как при связывании обработанной HDD липазы на том же самом носителе сохраняется 78% активности фермента. Таким образом, в случае ковалентного связывания присутствие гидрофобного соединения незначительно увеличивает этерификационную активность иммобилизованного фермента. Существенно более выраженный эффект наблюдается в случае адсорбции липазы на Celite 545: увеличение этерификационной активности про-

**Таблица 2.** Оптическое вращение 1-фенилэтилацетата, полученного в реакции ацетилирования (1*RS*)-фенилэтанола винилацетатом, при катализе копреципитатами липазы с различными соосаждителями

Соосаждитель липазы	$[\alpha]_{589}, ^\circ$ град	Превращение (1 <i>RS</i> )-фенилэтанола, %
–	80.4	42.5
СеАА	76.0	46.5
СеNH <sub>2</sub>	77.2	46.0
HDD	73.9	45.5
СеОН	70.5	48.0
PBMA	79.2	44.8

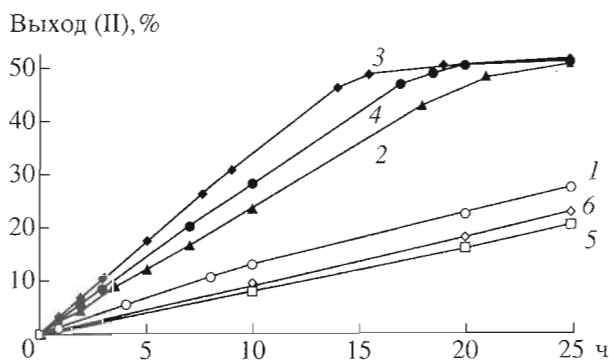
\* 20°С, ацетонитрил–вода (1 : 1).

**Таблица 3.** Активность исходной липазы и различных препаратов иммобилизованной липазы в реакции ацетилирования (1*RS*)-фенилэтанола винилацетатом в *трет*-бутилметиловом эфире

Препарат	Активность, <i>U</i> *	Относительная активность препаратов, %
Нативная липаза	1.528	100
Липаза на Celite	3.266	213
Липаза и СеАА на Celite	4.628	303
Липаза и HDD на Celite	4.208	276
Липаза на Eupergit C250L	1.131	74
Липаза и HDD на Eupergit C250L	1.200	78

\* В ммоль 1-фенилэтилацетата ч<sup>-1</sup> (мг фермента)<sup>-1</sup>.

исходит в 2.1 раза по сравнению с нативным ферментом, а в присутствии HDD и СеАА скорость этерификации увеличивается еще соответственно в 1.3 и 1.4 раза. Очевидно, присутствие гидрофобных соосаждителей играет большую роль при получении твердых катализаторов путем физической сорбции



**Рис. 3.** Кинетические кривые накопления продукта 1-фенилэтилацетата в реакции этерификации при катализе липазой, иммобилизованной на различных носителях. Количество липазы 0.036 мг. Препараты фермента: нативная липаза (1); липаза, сорбированная на Celite 545 (2–4) в отсутствие соосаждителей (2) и в присутствии СеАА (3) или HDD (4); липаза, иммобилизованная на Eupergit C250L в отсутствие соосаждителя (5) и в присутствии HDD (6).

белка. В этом случае, предположительно, происходит физическое осаждение активных копреципитатов на поверхность носителя. В то же время копреципитаты не могут быть химически привязаны на Eupergit C250L, поэтому и активность их почти не отличается от активности в отсутствие соосаждителей. Таким образом, гидрофобное соосаждение липазы может быть перспективно как само по себе, так и в комбинации с нанесением на твердые носители методом адсорбции.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческий препарат липазы из *Pseudomonas fluorescens* (содержание фермента 0.25% по весу), предоставленный компанией "RÖHM Pharma Polymers" (Германия), удельная активность препарата при гидролизе триацетина 1200 мкмоль уксусной кислоты  $\text{ч}^{-1} \text{г}^{-1}$ . Носитель цеолит (Celite 545) (Serva, Германия), полимерный метакриловый носитель с эпоксидными группами Eupergit C250L (Pharma Polymers, Германия). Растворители этилацетат (т. кип. 73°C) и диоксан (т. кип. 101°C), а также бутилметакрилат (53°C, 5 мм рт. ст.) (все Реахим, Россия) перегоняли. 1-Фенилэтанол, винилацетат, *трет*-бутилметилловый эфир, глицеринтриацетат (триацетин) (Merck, Германия), *N*-цетиламин, 1,2-гексадекандиол, цетиловый спирт (Fluka, Германия), окись алюминия L5/40 щелочная (Chemapol, Чехословакия), азобисизобутиронитрил (AIBN) (Реахим), ацетонитрил, уксусный ангидрид, триэтиламин, гексан, ацетон, калий фосфорнокислый однозамещенный марки "ч.д.а", хлорид натрия, хлорид кальция марки "ч.", едкий натр (Реахим) использовали без дополнительной очистки.

**(I)-Фенилэтилацетат (II).** К 0.05 моль спирта RS-(I) добавляли 0.15 моль уксусного ангидрида, 0.15 моль триэтиламина и 25 мл этилацетата. Реакционную смесь кипятили 4 ч, затем промывали (трижды) 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 4.5) и выделяли эфир RS-(II) перегонкой органической фазы, т. кип. 89°C/5мм рт. ст. [15].

**Разделение RS-(I), винилацетата и (II) в модельном эксперименте** проводили на хроматографической колонке LiChroCART RP 18 (5 мкм) (240 × 4 мм) фирмы Merck (Германия) на жидкостном хроматографе Beckman, рабочая версия "System Gold" (США). Величину оптического поглощения регистрировали при длине волны 260 нм. Оптимальные условия проведения ВЭЖХ: скорость потока 0.8 мл/мин, элюент-ацетонитрил-вода (1 : 1), 10-кратное разбавление исследуемой смеси элюентом и объем вводимой пробы 20 мкл (содержание RS-(I) 0.5 мкмоль и винилацетата 1.5 мкмоль); при таких условиях времена выхода RS-(I), винилацетата и (II) составляют соответственно 5.9, 6.2 и 13.5 мин. В качестве контрольных образцов использовали смесь (I) и (II) с содержанием последнего соответственно 10, 20, 31.4 и 40%, определенного методом газовой хроматографии. Содер-

жание (II), определенное методом офВЭЖХ, составило соответственно 9.7, 19.4, 30.0, 41.7%.

***N*-Цетилацетамид.** К 25 ммоль  $\text{CeNH}_2$  и 200 мл этилацетата при перемешивании по каплям добавляли 50 ммоль уксусного ангидрида и перемешивали 2 ч. Реакционную смесь промывали три раза водой, растворитель отгоняли под вакуумом, полученный CeAA перекристаллизовывали из гексана и сушили в эксикаторе, т. пл. 85°C [16].

**Полибутилметакрилат.** Для удаления гидрохинона (стабилизатор) мономер бутилметакрилат пропускали через колонку, наполненную окисью алюминия в гексане, и перегоняли. Полимеризацию проводили 40 мин в массе при 80°C, после предварительного барботирования азота. В качестве инициатора использовали AIBN (3% массы мономера). Полученный полимер растворяли в диоксане, отделяли от мономера переосаждением в этаноле и сушили в эксикаторе. Выход полимера 60%. Молекулярная масса PBMA, определенная вискозиметрически по стандартной методике [17], составляет 20000.

**Включение липазы в гидрофобные копреципитаты с CeOH,  $\text{CeNH}_2$ , CeAA и PBMA** осуществляли аналогично получению копреципитатов с HDD по методике, описанной ранее [12]. Липазу (0.2 г препарата) растворяли в 10 мл 0.01 М фосфатного буфера, рН 7.5 (буфер А) при 0°C и отделяли от нерастворимых примесей фильтрованием. Раствор 20 мг HDD в 0.7 мл теплого ацетона добавляли по каплям в раствор липазы при перемешивании. Ацетон удаляли в вакууме, и водный раствор выдерживали 24 ч при 6°C. Твердую фазу отделяли центрифугированием (8000 об/мин, 20 мин), лиофильно высушивали и хранили при 6–10°C. Содержание белка в копреципитатах определяли по остаточной гидролитической активности фермента, измеренной в супернатанте, учитывая содержание липазы в ее коммерческом препарате и исходную активность препарата.

**Иммобилизация липазы на частицах Celite 545 и носителе Eupergit C250L.** Липазу (80 мг порошка) растворяли при 0°C в 10 мл буфера А, отделяли от нерастворимых примесей фильтрованием, добавляли 1 г Celite 545 и инкубировали 72 ч при 6°C, затем удаляли воду. Полученный препарат фермента хранили при 6–10°C.

Аналогично из 100 мг порошка липазы в 10 мл буфера А и 1 г Eupergit C250L за 24 ч при 6°C получали препарат иммобилизованного фермента. Надосадочную жидкость декантировали и измеряли ее гидролитическую активность, по которой рассчитывали количество ковалентно связанной липазы с носителем. Препарат фермента сушили в токе воздуха на пористом стеклянном фильтре и хранили при 6–10°C.

Аналогично иммобилизовали препараты суспензии липазы с соосаждителями, приготовленные как описано выше.

**Гидролитическую активность растворимой и иммобилизованной липазы** определяли в реакции гидролиза триацетина. К 5 мл раствора субстрата, содержащего 0.1 М триацетин, 0.05 М хлорид натрия и 0.05 М хлорид кальция в ячейке титратора "Radiometer Copenhagen ТТТ 60", добавляли 50 мкл раствора, содержащего 2.5 мкг фермента, или 0.5 мг сухого копреципитата. Образующуюся в результате ферментативной реакции уксусную кислоту титровали 0.01 М раствором NaOH при pH 7.0 в течение 10–15 мин. По результатам титрования рассчитывали гидролитическую активность фермента в мкмоль уксусной кислоты  $\text{ч}^{-1}$  (мг фермента) $^{-1}$ .

**Активность липазы и ее иммобилизованных препаратов в реакции этерификации** определяли по начальной скорости реакции ацетилирования RS-(I) винилацетатом [7]. К 10 мл ТВМЕ добавляли 5 ммоль RS-(I) и 15 ммоль винилацетата, затем добавляли 14 мг порошка липазы или 2 мг копреципитата или 300 мг твердого носителя с иммобилизованной липазой, встряхивали при 37°C; через определенные промежутки времени (рис. 2, 3) отбирали аликвоты по 0.5 мл, твердые частицы катализатора отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин), и надосадочную жидкость анализировали как описано выше. По скорости накопления продукта реакции (II) рассчитывали начальную скорость ферментативной реакции в мкмоль (II)  $\text{ч}^{-1}$  (мг фермента) $^{-1}$ .

**Определение энантионаправленности реакции ацилирования, катализируемой препаратами липазы.** Для выделения (II), полученного при катализе различными копреципитатами липазы, 10 мл реакционной смеси упаривали в вакууме до 2.5 мл, твердые частицы катализатора отделяли центрифугированием, супернатант разбавляли элюентом в 5 раз и аликвоту хроматографировали как описано выше. Методом ВЭЖХ выделяли фрак-

цию, соответствующую по времени удерживания модельному соединению (II), и определяли оптическое вращение продукта (прибор Digital Polarimeter DIP-360 (Jasco, Япония)) при 589 нм (D-линия Na) в растворе ацетонитрил-вода (1 : 1) при 20°C.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Faber K.* Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook. 2nd ed. Berlin: Springer, 1995. P. 318–322.
2. *Wong C.H., Whitesides G.M.* Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. Pergamon: Trowbridge, 1995. P. 70–108.
3. *Brockman H.L.* // Lipase / Ed. B. Borstrom. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984. P. 505–523.
4. *Zaks A., Klivanov A.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 3192.
5. *Zaks A., Klivanov A.M.* // Science. 1984. V. 224. P. 1249.
6. *Martinek K., Levashov A.V., Khmelnskiy Yu.L., Klyachko N.L., Berezin I.V.* // Science. 1982. V. 218. P. 889–891.
7. *Laumen K., Breitgoff D., Schneider M.P.* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988. V. 18. P. 1459–1461.
8. *Norin M., Boutelje J., Holmberg E., Hult K.* // App. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. P. 527–530.
9. *Bosley J.A., Clayton J.C.* // Biotechnol. Bioeng. 1994. V. 43. P. 934–938.
10. *Ivanov A.E., Schneider M.P.* // J. of Molecular Catalysis. B: Enzymatic. 1997. V. 3. P. 303–309.
11. *Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J.* // Biotechnol. Bioeng. 1996. V. 49. P. 527–534.
12. *Горохова И.В., Иванов А.Е., Зубов В.П.* // Изв. Академии наук. Серия хим. 2001. № 1. С. 146–148.
13. *Okahata Y., Hatano A., Ijiro K.* // Tetrahedron: Asymmetry. 1995. V. 6. P. 1311–1322.
14. *Triantafyllou A.O., Wehtje E., Adlercreutz P., Mattiasson B.* // Biotechnol. Bioeng. 1995. V. 45. P. 406–414.
15. *Thorpe* // Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie. 1869. P. 412 (Beilstein 6, 476).
16. *Dyer A.* // J. Chem. Soc. V. 127. P. 73 (Beilstein 4 II, 660).
17. *Brandrup J., Immergut E.H.* Polymer Handbook. 3 ed. N.Y.: J. Wiley and Sons, 1989. VIII. P. 9.

## Coprecipitation of the *Pseudomonas fluorescens* Lipase with Hydrophobic Compounds As an Approach to Its Immobilization for Catalysis in Nonaqueous Media

I. V. Gorokhova<sup>#</sup>, A. E. Ivanov, and V. P. Zubov

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 336-0600; e-mail: irinagorokhova@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Mikiukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The precipitation of *N*-cetylamine, *N*-cetylacetamide, hexan-1,2-diol, cetyl alcohol, and poly(butyl metacrylate) in acetone–water media in the presence of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* was found to be accompanied by the coprecipitation of the enzyme. Within the lyophilized coprecipitates, the lipase exhibits a high catalytic activity and enantioselectivity in the reaction of (1*RS*)-phenylethanol acetylation with vinyl acetate in *t*-butyl methyl ether. In order of increasing lipase activity, the coprecipitates can be arranged in the series: cetyl alcohol, poly(butyl metacrylate), hexadecane-1,2-diol, *N*-cetylamine, and *N*-cetylacetamide, with the activity 2.5- to 19-fold exceeding the activity of the native enzyme. The immobilization of the lipase on solid supports, such as Celite 545 (physical sorption) and Eupergit C250L (covalent binding), in the presence of hexadecane-1,2-diol was found to increase the esterifying activity of the enzyme. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** cetyl alcohol, ester synthesis, hexadecane-1,2-diol, immobilization, *N*-cetylacetamide, poly(butyl metacrylate)