



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 07.09.2016 - действует
Пошлина: учтена за 4 год с 19.10.2016 по 18.10.2017

(21), (22) Заявка: **2013146613/10, 18.10.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2013

Приоритет(ы):

(66) Номер(а) и дата(ы) подачи ранее
поданной(ых) заявки(ок): **2009142994 23.11.2009**

(43) Дата публикации заявки: **27.04.2015**

(45) Опубликовано: **[27.02.2016](#)**

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **ШАПОВАЛОВА И.В. "Характеристика
новых мутантных форм пенициллинацилазы из
Escherichia coli", автореферат диссертации,
Москва 2007. WO 9820120 A1, 14.05.1998. ALKEMA
WB et.al. Role of alphaArg145 and betaArg263 in the
active site of penicillin acylase of Escherichia coli,
Biochem J. 2002 Jul 1;365(Pt 1):303-9.
US2005124029 A1, 09.06.2005.**

Адрес для переписки:

**119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, Центр трансфера технологий,
Дьяченко О.Г.**

(72) Автор(ы):

**Гуранда Дорел Феодорович (RU),
Ямскова Ольга Александровна (RU),
Панин Николай Владимирович (RU),
Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Российская Федерация, от имени которой
выступает Министерство образования и
науки Российской Федерации (RU),
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU)**

**(54) СПОСОБ УЛУЧШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ
ESCHERICHIA COLI И ПРИМЕНЕНИЕ МУТАНТНОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, к способу улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы. Заявленный способ включает изменение структуры пенициллинацилазы из *Escherichia coli* путем замены аминокислотного остатка 145 альфа-цепи на лейцин или аминокислотного остатка 71 бета-цепи на лейцин или аргинин. Способ приводит к улучшению каталитической активности пенициллинацилазы в реакциях стереоселективного ацилирования первичных аминогрупп химических соединений и стереоселективного гидролиза N-ацильных производных первичных аминосоединений. 6 табл., 5 пр.

Область техники

Изобретение относится к инженерной энзимологии, молекулярной биологии и биотехнологии, в частности к способу улучшения каталитических свойств ферментов.

Уровень техники

В настоящее время биокатализаторы широко используются в промышленности для проведения в мягких условиях химических превращений с высокой хемо-, регио- и стереоизбирательностью [Industrial enzymes. Eds. J. Polaina and A.P. MacCabe. Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007.]. Пенициллинацилаза из разных источников используется в фармацевтической промышленности при получении полусинтетических β -лактамных антибиотиков [A. Bruggink et al. Org. Process Res. Dev. 1998, 2, P.128.]. Широкая субстратная специфичность и стереоселективность могут дать возможность применения пенициллинацилазы в тонком органическом синтезе для получения энантиомеров α -, β -

γ -аминокислот и их элементоорганических аналогов [Svedas V.K. et al. Annal N.Y. Acad. Sci. 1996, 799, P.659.] для высокоэффективного стереоселективного ацилирования аминосоединений в водной среде и получения энантиомерно чистых соединений [WO 02/20820, 14-03-2002; WO 02/20821, 14-03-2002; D.T. Guranda et al. Tetrahedron: Asymm. 2004, 15, P.2901.]. Однако каталитические свойства природных ферментов ограничены.

Принимая во внимание высокий биокаталитический потенциал, пенициллинацилаза является объектом биоинженерии с целью создания биокатализаторов с улучшенными свойствами. Для улучшения каталитических свойств фермента используют методы, основанные на изменении его первичной структуры посредством введения мутаций или рекомбинации генов. В ряде работ было показано, что методами генной инженерии можно изменить субстратную специфичность и каталитические свойства пенициллинацилазы. В частности, в результате многоточечных мутаций была изменена архитектура участка связывания ацильной группы субстрата в активном центре фермента и таким образом впервые был получен рекомбинантный препарат пенициллинацилазы активный по отношению к цефалоспоринолу С [B. Oh et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 319, P.486]. Принципиальным достижением последних лет, открывающим новые возможности улучшения каталитических свойств фермента, является конструирование пермутированной одноцепочечной пенициллинацилазы, экспрессия которой не зависит от автокаталитического расщепления [G. Flores et al. J. Protein Science. 2006, 13, P.1677.].

В то время как большинство случайных мутаций практически не сказываются на каталитических свойствах пенициллинацилазы, отдельные мутации аминокислотных остатков могут существенно повлиять на субстратную специфичность и каталитические свойства фермента. Показательными являются примеры, когда методом направленной эволюции были получены мутантные варианты пенициллинацилазы из *E.coli* и *K.Citrophila* по положению Phe β 71, с измененной специфичностью по отношению к ацильной части субстратов, впервые способные катализировать гидролиз адипил- и глутарил-L-лейцина [L.J. Forney et al. Appl. Environ. Microbiol. 1989, 55(10), P.2550.; A. Roa et al. Biochem. J. 1994, 303, P.869.]. Результаты этих работ свидетельствуют о том, что «оборотной стороной» такой мутации в пенициллинацилазе является драматическое снижение активности по отношению к природным субстратам пенициллину G и V по сравнению с диким типом фермента.

В литературе большее число работ направлено на получение вариантов фермента с большей каталитической активностью в реакции гидролиза по отношению к ограниченному кругу природных и цветных высокоспецифических субстратов, которые традиционно используются для слежения за ферментативной активностью. Между тем пенициллинацилаза является высоко активным и стабильным ферментом в водной среде [V.K. Svedas et al. FEBS Lett. 1997, 417, P.414.; Д.Ф. Гуранда и др. Биохимия. 2004, 69(12), С.1700.], поэтому задача увеличения гидролитической активности фермента по отношению к природным и цветным высокоспецифическим субстратам, на наш взгляд, не является принципиальной. Более ценным считаем биоинженерию пенициллинацилазы с целью увеличения активности по отношению к неприродным и неспецифическим субстратам, увеличения стереоселективности, а также увеличения способности фермента катализировать ацилирование различных аминосоединений.

Несмотря на высокий синтетический потенциал пенициллинацилазы, известно всего несколько научных трудов по получению вариантов фермента с увеличенной способностью катализировать реакции ацилирования, где показано, что варианты пенициллинацилазы из *E.coli* по положениям Arg α 145 и Phe α 146 в 2-4 раза эффективнее катализируют синтез пенициллина и ампициллина методом ацильного переноса по сравнению с диким типом. [W.B.L. Alkema et al. Protein Engineering. 2000, 13(12), P.857.; W.B.L. Alkema et al. Biochem. J. 2002, 365, P.303.].

В научной литературе нет сведений относительно влияния мутаций на стереоселективность пенициллинацилазы.

Патентная литература по вопросам биоинженерии пенициллинацилазы ограничивается несколькими патентами одной группы авторов. В заявке [WO 9605318, 22-02-1996] заявлено изменение субстратной специфичности и активности пенициллинацилазы мутацией аминокислотных остатков по значительному числу сайтов альфа-цепи (α 139-152) и бета-цепи (β 20-27, β 31, β 32, β 49-52, β 56, β 57, β 65-72, β 154-157, β 173-179, β 239-241, β 250-263, β 379-387, β 390, β 455, β 474-480), хотя патент основан на нескольких примерах влияния мутаций по отдельным

положениям Met α 143, Phe α 147, Leu β 56, Ala β 67, Ile β 177 в пенициллинацилазе из *Alcaligenes faecalis* на способность фермента катализировать гидролиз природных пенициллинов G и V, а также синтез ампициллина. В следующих патентных документах [WO 9820120, 14-05-1998; US 6403356, 11-06-2002] круг вариантов пенициллинацилазы существенно сужен и ограничен мутациями по сайтам Met α 142, Phe α 146, Phe β 24, Val β 56, Ile β 177. Приоритетные права данных заявок ограничиваются способом получения 6-аминопенициллановой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот ферментативным гидролизом их ацилированных форм, а также способом получения β -лактамов ферментативным ацилированием 6-аминопенициллиновой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот.

Таким образом, за исключением случая улучшения каталитической активности по отношению к природным субстратам, ранее заявленные способы не затрагивают такие ключевые свойства пенициллинацилазы, как стереоселективность и способность ацилирования различных классов аминокислотных соединений, а также способов применения таких препаратов с целью получения энантиомерно чистых соединений.

Раскрытие изобретения

Технической задачей настоящего изобретения является создание пенициллинацилазы с повышенной каталитической активностью и стереоселективностью в реакциях ацилирования широкого круга аминокислотных соединений и гидролиза их N-ацильных производных, а также их применение для проведения биокаталитических превращений, в частности, с целью получения энантиомерно чистых соединений. Зачастую, настоящее изобретение не имеет отношение к способам получения 6-аминопенициллановой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот ферментативным гидролизом их ацилированных форм, а также способы получения β -лактамов антибиотиков ферментативным ацилированием 6-аминопенициллиновой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой кислот.

Техническим результатом заявленного способа является создание препаратов пенициллинацилазы с увеличенной каталитической эффективностью и стереоизбирательностью в реакциях ацилирования широкого круга аминокислотных соединений и гидролиза их N-ацильных производных, а также их применения для проведения биокаталитических превращений, в том числе для получения функционализированных и энантиомерно чистых соединений.

Поставленная задача решается путем изменения структуры пенициллинацилазы заменой одного или нескольких остатков альфа и бета-цепи фермента, которые соответствуют сайтам α 138-151 и β 67-73 пенициллинацилазы из *E.coli*. Здесь имеется в виду нумерация аминокислотных остатков согласно общепринятым методам выравнивания аминокислотной последовательности пенициллинацилаз из разных источников, например [R.M.D. Verhaert et al. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63(9), P.3412.]

Наиболее близкими к заявленному решению является способ улучшения свойств пенициллинацилазы, описанный в рассмотренных выше патентных документах [WO 9605318, 22-02-1996; WO 9820120, 14-05-1998; US 6403356, 11-06-2002].

В научной и патентной литературе не известны примеры повышения каталитических свойств пенициллинацилазы по отношению к природным субстратам, в частности, каталитической эффективности и стереоизбирательности в реакциях ацилирования широкого круга аминокислотных соединений и гидролиза их N-ацильных производных, включающие изменение структуры фермента путем замены одного или нескольких остатков альфа и бета-цепи фермента в положениях 138-151 и 67-73, а новая функция и предлагаемое назначение не вытекают с очевидностью из его известной структуры, принятого назначения или, как следствие, ранее известных свойств.

Таким образом, настоящее изобретение относится к инженерной энзимологии, молекулярной биологии и биотехнологии, а именно к получению и применению вариантов пенициллинацилазы из разных источников, полученных из предшественника фермента посредством замены одного или нескольких остатков альфа и бета-цепи фермента, соответствующие сайтам α 138-151 и β 67-73 пенициллинацилазы из *E.coli*, любыми доступными методами генной инженерии, направленной эволюции или селекции.

Предпочтительным является получение и применение вариантов пенициллинацилазы, содержащих замены по сайтам, соответствующих α 145, α 146 и β 71 пенициллинацилазы из *E.coli*. Наиболее предпочтительным является получение и применение варианта пенициллинацилазы β 71.

В качестве источника пенициллинацилазы могут быть использованы бактерии, в частности, из *A.faecalis*, *B.megaterium*, *K.Citrophila*, *P.rettgeri*, *A.viscosus* и др.

Субстратами в ферментативных реакциях гидролиза могут быть соответствующие эфиры и амиды карбоновых кислот, в частности фенилуксусной и феноксиуксусной кислоты и их замещенных производных в α -положении и в ароматическом кольце. Предпочтительным является использование амидов и эфиров фенилуксусной, п-гидрокси-фенилуксусной, феноксиуксусной, R- и S-миндальной кислоты, R- и S-фенилглицина.

В качестве ацильных доноров могут быть использованы карбоновые кислоты, в частности фенилуксусная и феноксиуксусная кислота и их замещенные производные в α -положении и в ароматическом кольце, а также их амиды и эфиры. Предпочтительным является использование амидов и эфиров фенилуксусной, п-гидрокси-фенилуксусной, феноксиуксусной, R- и S-миндальной кислоты, R- и S-фенилглицина.

Пенициллинацилаза по изобретению может быть получена и использована в виде гомогенного препарата, раствора с содержанием других химических соединений или белков, мицелл, агрегатов, или в твердом состоянии в виде кристаллов или иммобилизованных в геле, на различных подложках и носителях препаратах, или применяется в виде культуры клеток.

Препараты биокатализаторов на основе пенициллинацилазы по изобретению могут применяться с целью:

- проведения биокаталитических превращений, в том числе протекающих хемо-, регио- и стереоизбирательно;
- проведения ацилирования первичных аминосоединений, в частности, для ацилирования аминов, аминок спиртов, аминокислот, их амидов и эфиров, пептидов и пептидомиметиков, а также их элементоорганических аналогов;
- проведения гидролиза амидной и эфирной связи, в частности, для гидролиза амидов и эфиров. O- или N-ацилированных производных спиртов, аминов, аминок спиртов, аминокислот, их амидов и эфиров, пептидов и пептидомиметиков, а также их элементоорганических аналогов;
- получения химических соединений, в том числе энантиомерно чистых соединений, в частности спиртов, аминов, аминок спиртов, аминокислот, их амидов, эфиров и ацильных производных, пептидов и пептидомиметиков, а также их элементоорганических аналогов.

Способ применения реализуется приведением в контакт препарата пенициллинацилазы и реакционной смеси. В качестве реакционной среды может быть использована вода, однофазные и многофазные водно-органические смеси, растворы с содержанием органических и неорганических соединений, в частности солей, кислот, оснований. В качестве реакционной среды более предпочтительным является использование воды или водных растворов с содержанием не более 40% (по объему) органических растворителей.

Способ применения препарата пенициллинацилазы по изобретению может быть как независимым, так и в комбинации с другими катализаторами и биокатализаторами.

Некоторые примеры реализации способа улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы и способа их применения по изобретению приведены ниже. Варианты пенициллинацилазы из *E.coli* получали путем конструирования мутантного гена методом сайт-специфического мутагенеза по методикам, описанным в статьях [V. Picard et al. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, P.2587.; W.B.L. Alkema et al. *Protein Eng.* 2000, 13, P.857]. После процедур клонирования, культивирования, выделения и очистки были получены гомогенные препараты мутантов пенициллинацилазы.

Осуществление изобретения

Пример 1. Увеличение каталитической активности пенициллинацилазы.

Каталитическую активность пенициллинацилазы измеряли с использованием удобного для регистрации цветного субстрата 6-нитро-3-(фенилацетамид)бензойной кислоты. Количественной мерой каталитической активности являются каталитическая константа ($k_{кат}$) и константа специфичности ($k_{кат}/K_M$), значения которых в случае варианта

β Phe71Leu в 2 и в 6 раз выше соответствующих значений для пенициллинацилазы дикого типа (табл.1).

Таблица 1		
Каталитическая активность вариантов пенициллинацилазы (pH 7,5, 0,1 М KCl, 25°C)		
Фермент	$k_{кат}, c^{-1}$	$(k_{кат}/K_M) \cdot 10^{-3}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
Дикий тип	26	867
Phe β 71Leu	53	5242

Пример 2. Увеличение стереоселективности пенициллинацилазы по отношению к N-ацильным производным аминосоединений.

Сравнение стереоизбирательности пенициллинацилаз по отношению к N-ацильным производным аминосоединений проводили на основании значений стереоселективности (E) ферментативного гидролиза ряда N-ацильных производных аминосоединений. В случае варианта Phe β 71Leu значение стереоселективности гидролиза производных фенилуксусной и миндальной кислот примерно в 2-4 раза выше, чем в случае пенициллинацилазы дикого типа (табл.2 и 3). В случае варианта Arg α 145Leu наблюдается увеличение стереоселективности примерно в

1,5 раза относительно пенициллинацилазы дикого типа (табл.3). Следует отметить значительное влияние структуры ацильной части субстрата на стереоселективность ферментативной реакции.

Таблица 2		
Стереоселективность пенициллинацилазы по отношению к N-фенилацетильным производным аминокислот (pH 7,5, 25°C)		
Субстрат	Препарат фермента	
	дикий тип	Pheβ 71Leu
N-Phac-(±)-2-аминобутанол	4	15
N-Phac-(±)-2-амино-4-метилпентанол	36	60
N-Phac-(±)-фенилаланинол	2	7

Таблица 3				
Стереоселективность пенициллинацилазы по отношению к N-(R)-манделил-производным аминокислот (pH 7,5, 25°C)				
Субстрат	Препарат фермента			
	дикий тип	Pheβ 71Leu	Pheβ 71Arg	Argα 145Leu
N-(R)-Манделил-(±)-2-аминобутанол	25	100	120	37
N-(R)-Манделил-(±)-фенилаланинол	4,2	39	120	7,4

Пример 3. Изменение стереоселективности и синтетической способности пенициллинацилазы в реакциях ацильного переноса.

Сравнение стереоизбирательности и синтетической способности вариантов пенициллинацилазы проводили на примере ацилирования рацемата 2-аминобутанола амидом (R)-миндальной кислоты. В рассмотренном ряду варианты пенициллинацилазы по положению Pheβ 71 характеризуются предельными значениями скорости синтеза, соотношением начальных скоростей накопления продуктов синтеза и гидролиза (C/Г)₀ и стереоселективности (E). С одной стороны, в случае вариантов Pheβ 71Leu и Pheβ 71Arg наблюдаемое увеличение по каждому из показателей составляет примерно 5-30 раз в сравнении с диким типом (табл.4). И напротив, в случае варианта Pheβ 71Trp происходит обратный эффект.

Таблица 4			
Кинетические параметры ферментативного стереоселективного ацилирования рацемата 2-аминобутанола амидом R-миндальной кислоты (pH 9,5, 25°C)			
Фермент	V _C /[E] ₀ , у.е.	(C/Г) ₀ , у.е.	E
Дикий тип	1	1	26
Pheβ 71Trp	0,31	0,13	2,9
Pheβ 71Leu	22	8,5	95
Pheβ 71Arg	31	10	120
Argα 145Leu	6,3	3,8	35

Пример 4. Получение энантиомеров соединений при использовании вариантов пенициллинацилазы методом ферментативного гидролиза.

Энантиомеры аминокислот получали в результате ферментативного гидролиза рацемата N-ацильного производного до 50% конверсии как описано в экспериментальной части. Продукты наиболее высокой

энантиомерной чистоты (S)-аминобутанола и (R)-фенилаланинола были получены в случае применения вариантов пенициллинацилазы по положению Phe β 71.

Таблица 5				
Энантиомерный избыток продукта ферментативного гидролиза рацемата (R)-манделил-производного аминоксоединения				
Продукт гидролиза	Препарат фермента			
	Дикий тип	Phe β 71Leu	Phe β 71Arg	Arg α 145Leu
(S)-аминобутанол	87%	93%	95%	86%
(R)-фенилаланинол	46%	89%	45%	60%

Пример 5. Получение энантиомерно чистых соединений при использовании вариантов пенициллинацилазы методом ацильного переноса.

Энантиомерно чистые амиды (диастереомеры) получали в результате ферментативного ацилирования рацемата аминоксоединения при использовании амида (R)-миндальной кислоты в качестве ацильной донора, как описано в экспериментальной части. Наибольшие значения энантиомерного избытка продукта синтеза наблюдаются в случае применения вариантов пенициллинацилазы Phe β 71.

Таблица 6				
Энантиомерный избыток продукта стереоселективного ацилирования рацемата аминоксоединения амидом (R)-миндальной кислоты				
Продукт синтеза	Препарат фермента			
	Дикий тип	Phe β 71Leu	Phe β 71Arg	Arg α 145Leu
N-(R)-манделил-(S)-аминобутанол	89%	98%	99%	93%
N-(R)-манделил-(R)-фенилаланинол	61%	95%	30%	76%

Описание экспериментальной части

Определение ферментативной активности

Активность мутантных форм пенициллинацилазы определяли спектрофотометрически по накоплению хромофора в процессе гидролиза 1 мМ раствора цветного субстрата 6-нитро-3-(фенилацетамид)бензойной кислоты при 400 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 (Япония). Реакцию проводили при 25°C в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,5, 0,1 М KCl.

Определение концентрации активных центров

Абсолютную концентрацию активных центров каждой из мутантных форм пенициллинацилазы определяли титрованием активных центров фермента необратимым ингибитором фенилметилсульфонилфторидом по методике [В.К. Швядас и др. Биоорг. химия. 1977, 3, С.546.]. Остаточную ферментативную активность определяли спектрофотометрически по гидролизу цветного субстрата, как описано выше.

Определение кинетических параметров

Кинетические параметры ферментативного превращения (K_M и $k_{кат}$) определяли общепринятым методом путем анализа зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата. Реакции проводили в рамках схемы Михаэлиса-Ментен ($S_0 \gg E_0$) в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,5, 0,1 М KCl) при 25°C.

ВЭЖХ анализ. Количественное определение компонентов реакционной смеси проводили методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографической системе Perkin Elmer 200 Series (США); колонка Luna C18 (Phenomenex, США), 250×4.6 мм, размер частиц 5 μ м; подвижная фаза CH₃CN/вода 40:60, 0,78 г/л KН₃PO₄, 0,5 г/л додецилсульфата натрия, pH 3,0; скорость потока 0,8 мл/мин; объем вкола 10 мкл; УФ детектирование при 210 нм.

Определение энантиомерного избытка первичных аминоксоединений определяли методом предколонной модификации о-фталевым альдегидом и хиральным тиолом по методике [D.T. Guranda et al J. Chromatogr. A. 2005, 1095. P.89.].

Проведение стереоселективного гидролиза

Реакцию стереоселективного ферментативного гидролиза рацемата N-ацильного производного аминоксоединения проводили в термостатируемой ячейке рН-стата Titrimo 719 (Metrohm, Швейцария) при 25°C, рН 7,5 при постоянном перемешивании до достижения 50% степени конверсии. Начальные концентрации реагентов: 10 мМ субстрата, активных центров пенициллинацилазы 0,1 мкМ, объем реакционной смеси 5 мл. Время проведения эксперимента не превышало 5 часов. По ходу протекания реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты, разбавляли их мобильной фазой и анализировали методом ВЭЖХ. Затем реакционную смесь подкисляли до рН 1,5 бн. HCl и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Аминоксоединение, высвободившееся в ходе ферментативного гидролиза, распределялось в водном слое. Для определения энантиомерного избытка аминоксоединения аликвоту полученного водного раствора анализировали методом ВЭЖХ с предколонной дериватизацией. Стереоселективность ферментативного гидролиза определяли по значению энантиомерного избытка образующегося аминоксоединения при 50% степени конверсии.

Проведение стереоселективного ацильного переноса

Реакцию стереоселективного ферментативного ацилирования рацемата первичного аминоксоединения, катализируемого пенициллинацилазой, проводили в водной среде методом ацильного переноса от амида (R)-миндальной кислоты. Начальные концентрации реагентов: 100 мМ ацильного донора, 100 мМ рацемата аминоксоединения, концентрация активных центров пенициллинацилазы 10 мкМ. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке рН-стата Titrimo 719 (Metrohm, Швейцария) при 25°C, рН 9,5 при постоянном перемешивании. Время проведения эксперимента составляло от 30 мин. Затем реакционную смесь подкисляли до рН 3,06 н. HCl и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Продукт синтеза распределялся в органическом слое. Органический слой выпаривали, а остаток растворяли в 5 мл водно-этанольного раствора. Для определения энантиомерного избытка продукта синтеза аликвоту полученного раствора анализировали методом ВЭЖХ. По ходу протекания реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты, разбавляли их мобильной фазой и анализировали методом ВЭЖХ. Эффективность ацильного переноса определяли как соотношение начальных скоростей накопления продуктов синтеза (С) и гидролиза (Г). Стереоселективность ацильного переноса определяли как соотношение начальных скоростей накопления продуктов ацилирования двух энантиомеров аминоксоединения.

Формула изобретения

Способ улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы из *Escherichia coli* в реакциях стереоселективного ацилирования первичной аминогруппы аминокспиртов и гидролиза N-ацильных производных первичных аминокспиртов, включающий изменение структуры пенициллинацилазы путем замены аминокислотного остатка 71 бета-цепи на лейцин или аргинин или путем замены аминокислотного остатка 145 альфа-цепи.

PD4A Изменение наименования, фамилии, имени, отчества патентообладателя

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (RU)

Адрес для переписки:

119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, 1, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное интеллектуальное развитие"

Дата внесения записи в Государственный реестр: **19.08.2016**

Дата публикации: [10.09.2016](#)
