

УДК 577.15.1

## РЕКОМБИНАНТНАЯ ГИДРОЛАЗА ЭФИРОВ АЛЬФА-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 – ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР СИНТЕЗА ЦЕФАЛЕКСИНА

А.В. Складенко<sup>2</sup>, О.В. Березина<sup>2</sup>, Д.Э. Сатарова<sup>2</sup>, В.В. Федорчук<sup>1,3</sup>, Е.А. Федорчук<sup>1,3</sup>,  
С.С. Савин<sup>3,4</sup>, С.В. Яроцкий<sup>2</sup>, В.И. Тишков<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ; <sup>2</sup> ГосНИИгенетика;  
<sup>3</sup> ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; <sup>4</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Исследована эффективность гидролазы эфиров альфа-аминокислот из бактерий *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 (ХгАЕН, КФ 3.1.1.43) в синтезе амино-бета-лактамного антибиотика цефалексина. Показано, что ХгАЕН, продуцируемая рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* ВКПМ В-11246 (г-ХгАЕН), по эффективности синтеза цефалексина значительно превосходит нативный фермент wt-ХгАЕН, получаемый из мутантного штамма *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915. При использовании в качестве биокатализатора г-ХгАЕН добавление в реакционную среду этиленгликоля в концентрации 33 об.% позволяет повысить выход целевого продукта с 70 до 95%. При проведении синтеза цефалексина в оптимальных условиях в случае нативного фермента wt-ХгАЕН выход цефалексина составляет 85% по сравнению с 95% для г-ХгАЕН. Кроме того, в отличие от ферментных препаратов нативной wt-ХгАЕН препараты рекомбинантной г-ХгАЕН не обладают побочной бета-лактамазной активностью.

**Ключевые слова:** гидролаза эфиров альфа-аминокислот, рекомбинантный фермент, цефалексин, синтез.

В настоящее время рынок антибактериальных препаратов, согласно различным оценкам, составляет более 20 миллиардов долларов США в год, из которых не менее половины приходится на долю бета-лактамных антибиотиков [1]. Эти антибиотики получают с помощью биокаталитических процессов ацилирования бета-лактамного ядра (6-аминопенициллановая кислота, 7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислота и др.) соответствующими заместителями [2–5]. При этом как в научных разработках, так и в промышленности в качестве биокатализатора, как правило, используют фермент пенициллинацилаза (РА), которая относится к классу Ntn-гидролаз. При синтезе пенициллинов и цефалоспоринов с помощью РА в качестве донора ацильной части антибиотика применяются в основном амиды соответствующих карбоновых кислот [6]. Первой стадией процесса является гидролиз амида с образованием ацил-производного РА. Поскольку большинство амидов обладают высокой стабильностью по отношению к гидролизу, образование ацил-фермента может быть одной из скорость-лимитирующих стадий всего процесса.

Скорость образования ацил-фермента может быть существенно повышена, если в качестве донора ациль-

ной части использовать сложные эфиры, а не амиды. Одним из перспективных ферментов, способных осуществлять такой процесс, является гидролаза эфиров альфа-аминокислот (alpha-amino acid ester hydrolase, АЕН, КФ 3.1.1.43), относящаяся к классу гидролаз с укладкой  $\alpha/\beta$ -типа. АЕН обладает высокой специфичностью по отношению к сложным эфирам, содержащим аминогруппу в качестве заместителя у  $C_{\alpha}$ -атома кислоты, и способна катализировать N-ацилирование 7-аминоцефема и 6-аминопенама этими эфирами с образованием амидной связи [7, 8]. Благодаря такой специфичности она может быть использована для синтеза клинически значимых амино-бета-лактамных антибиотиков из группы как аминопенициллинов (ампициллин, амоксициллин), так и аминоцефалоспоринов I (цефалексин, цефадроксил, цефалоглицин, цефрадин) и II (цефроксадин, цефаклор, цефатризин, цефпрозил) поколений.

АЕН относится к ацилазам бета-лактамов и является довольно редким ферментом. К настоящему времени в литературе описано всего десять природных микробных штаммов, продуцирующих этот фермент [7, 8], а клонированы и экспрессированы в *Escherichia coli* гены всего трех АЕН – из *Acetobacter*

*turbidans*, *Xanthomonas citri* и *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [7–12]. Ген четвертой АЕН (ХгАЕН) был клонирован нами из мутантного штамма *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 [13]. Был также создан рекомбинантный штамм *E. coli* ВКПМ В-11246, который превосходит исходный штамм *X. rubrilineans* ВКПМ В-9915 по уровню экспрессии ХгАЕН в 20 раз [14]. Кроме того, при получении фермента переход на рекомбинантный штамм *E. coli* ВКПМ В-11246 позволил сократить время культивирования по сравнению с *X. rubrilineans* ВКПМ В-9915 примерно в 3 раза.

Цель данной работы – сопоставление синтетазного потенциала водорастворимых ферментных препаратов гидролазы эфиров альфа-аминокислот. Были изучены препараты ХгАЕН, полученные на основе рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-11246 (r-ХгАЕН) и исходного штамма *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 (wt-ХгАЕН). В качестве модельной системы для сопоставления синтетазного потенциала этих АЕН использовали процесс синтеза аминоцефалоспоринового антибиотика цефалексина из ключевого полупродукта 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты (7-АДЦК) и ацилирующего агента метилового эфира D-фенилглицина (МЭФГ).

#### Материалы и методы

В работе были использованы 7-АДЦК (98,7%, СК «Биохимик»), МЭФГ гидрохлорид (98,0%, «Lancaster») и цефалексин моногидрат (стандарт) (99%, «Sigma»).

#### Получение ферментных препаратов

Биосинтез нативного фермента wt-ХгАЕН в *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 и r-ХгАЕН в *E. coli* ВКПМ В-11246 осуществляли согласно [15] и [14] соответственно. Разрушение клеточной биомассы обоих штаммов проводили на установке «French Press». Полученную суспензию дополнительно разбавляли 0,1 М фосфатным буфером, рН 6,5 (Буфер А), а затем в нее добавляли жидкий анионит, содержащий пиридиниевые основания. Осадок удаляли центрифугированием. Целевой фермент осаждали из бесклеточных экстрактов полиэтиленгликолем. Полученную суспензию центрифугировали, осадок отделяли и перерастворяли в Буфере А. Нерастворившиеся балластные белки удаляли центрифугированием. Для стабилизации фермента в растворы добавляли меркаптоэтанол, взятый в количестве 1 мкл на 15–25 мг белка. Удельная активность растворимых препаратов нативной wt-ХгАЕН и рекомбинантной r-ХгАЕН в реакции синтеза цефалексина составляла 4,9 и 225 ед. активности (МЕ) на 1 мг белка соответственно. Об-

щую концентрацию белка в растворе определяли методом Брэдфорда.

#### Определение синтетазной активности

Активность препаратов нативной wt-ХгАЕН и рекомбинантной r-ХгАЕН определяли по скорости синтеза цефалексина в следующих условиях: 0,1 М Натрифосфатный буфер (рН 6,0–6,2), температура (40±1)°С, концентрация субстратов 7-АДЦК и МЭФГ соответственно 40±2 и 80±4 мМ. Концентрацию цефалексина в реакционной смеси определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «GILSON» с использованием колонки размером 4×250 мм, заполненной сорбентом Kromasil C<sub>18</sub> с диаметром частиц 5–10 мкм, и спектрофотометрической детекции при 254 нм. ВЭЖХ осуществляли в изократическом режиме в 0,05 М аммоний-фосфатном буфере (рН 2,11), содержащем 34 об.% метанола (скорость потока 1 мл/мин). Объем пробы составлял 20 мкл. Перед нанесением образец разводили элюирующим буфером в 30–50 раз.

За единицу ферментативной активности в реакции синтеза цефалексина (1 МЕ) принимали такое количество препарата фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль целевого продукта за 1 мин в указанных выше условиях.

#### Проведение процесса ферментативного синтеза цефалексина

Синтез цефалексина с использованием wt-ХгАЕН и r-ХгАЕН проводили при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки в 0,3 М натрий-фосфатном буфере в термостатируемом стеклянном реакторе (30±1°С), снабженном системой контроля и поддержания рН. Концентрация 7-АДЦК и МЭФГ в реакционной смеси составляла 102 и 225 мМ соответственно (молярный избыток [МЭФГ]/[7-АДЦК] = 2,2); эффективная активность фермента 4,7–5,3 МЕ/мл; объем исходной реакционной смеси 30 мл; исходное значение рН 6,25±0,05. В ряде экспериментов реакционная смесь содержала 33 об.% этиленгликоля.

Раствор субстратов помещали в реактор и термостатировали в течение 15 мин, инициировали реакцию добавлением препарата фермента. В ходе реакции происходило снижение рН среды. По достижении рН 6,00±0,05 для поддержания данного значения осуществляли автоматическую подтитровку реакционной смеси 1 М раствором гидроксида натрия, фиксируя расход титранта. Изменение объема реакционной смеси за счет добавления титранта учитывали при расчете текущей концентрации компонентов. Через определенные промежутки времени из реакционной

смеси отбирали пробы для анализа ее состава методом ВЭЖХ по четырем компонентам: источнику бета-лактамного ядра 7-АДЦК, ацилирующему агенту МЭФГ, целевому антибиотику цефалексину (ЦЕЛ) и побочному продукту – D-фенилглицину (ФГ). На основании полученных данных анализировали динамику процесса по всем компонентам и осуществляли расчет материального баланса. Баланс (в процентах) по соединениям, несущим бета-лактамное ядро, рассчитывали как сумму содержания в реакционной смеси 7-АДЦК и цефалексина в текущий момент времени, отнесенную к содержанию 7-АДЦК в исходной реакционной смеси. Баланс (в процентах) по соединениям, несущим фенильный радикал – остаток боковой цепи D-фенилглицина, рассчитывали как сумму содержания в реакционной смеси МЭФГ, ФГ и цефалексина в текущий момент времени, отнесенную к содержанию МЭФГ в исходной реакционной смеси. Относительное содержание МЭФГ и ФГ в текущий момент времени (по отношению к содержанию МЭФГ в исходной реакционной смеси) рассчитывали, исходя из текущих молярных концентраций этих компонентов, определенных методом ВЭЖХ.

При изучении динамики синтеза цефалексина контроль за протеканием процесса методом ВЭЖХ осуществляли в режиме ступенчатого градиента содержания метанола в подвижной фазе, состоящей из 0,05 М аммоний-фосфатного буфера (pH 2,1) и метанола: 0–6 мин (2% метанола); 7–15 мин (45% метанола). Анализ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «GILSON» с использованием хроматографической колонки 4×250 мм, заполненной сорбентом

Spherisorb ODS C<sub>18</sub> с диаметром частиц 5–10 мкм и инжектора с дозирующей петлей 20 мкл. Расход подвижной фазы 1 мл/мин; спектрофотометрическая детекция при 214 нм, разведение проб реакционной смеси в 500–1100 раз.

### Результаты и обсуждение

В силу термодинамических причин биокаталитический синтез бета-лактамов осуществляется путем переноса на молекулу с бета-лактамным ядром (6-АПК, 7-АЦК, 7-АДЦК и др.) ацильной группы, донором которой в случае АЕН является метиловый эфир соответствующей альфа-аминокислоты. На рис. 1 представлены основные процессы, протекающие при синтезе цефалексина с помощью АЕН. Источником бета-лактамного ядра является 7-АДЦК, а в качестве ацилирующего агента, содержащего остаток D-фенилглицина, выступает его метиловый эфир МЭФГ.

В реакционной системе фермент катализирует три конкурирующие реакции: целевой синтез антибиотика и два побочных гидролитических процесса – гидролиз сложноэфирной связи ацилирующего агента и ациламидной связи антибиотика. По мере расхода исходных субстратов скорость синтеза цефалексина и скорость первой побочной реакции падают, а скорость второй побочной реакции возрастает. В результате в определенный момент скорость синтеза и скорость гидролиза цефалексина становятся равными. В результате в системе устанавливается кинетически контролируемое равновесие, от которого зависит выход целевого антибиотика [3, 5, 6]. Процесс синтеза необходимо оста-

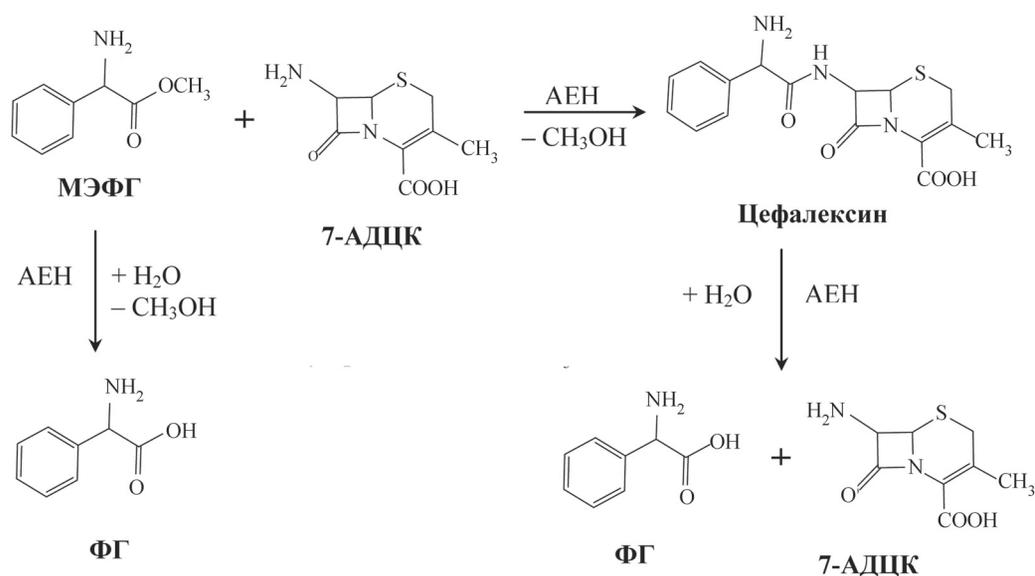


Рис. 1. Схема ферментативного синтеза цефалексина из 7-АДЦК и МЭФГ, катализируемого АЕН

навливать именно в этот момент. Чтобы его не пропустить, в ходе реакции постоянно контролируют концентрацию как исходных субстратов, так и продуктов. Поэтому процессы синтеза бета-лактамов путем ацильного переноса на бета-лактаманное ядро называют кинетически контролируемы.

Как видно из рис. 1, побочные процессы гидролиза донора ацильной группы МЭФГ и целевого продукта цефалексина протекают с участием воды. Снижение концентрации воды в реакционной среде должно замедлять эти процессы, а следовательно, можно ожидать увеличения выхода целевого продукта. Ранее было показано, что введение в реакционную среду смеси-вающих с водой органических растворителей, в том числе этиленгликоля, эффективно влияет на выход целевого антибиотика при кинетически контролируемом синтезе бета-лактамов [5, 6]. Поэтому на первом этапе были проведены синтезы цефалексина в водной среде и в присутствии 33 об.% этиленгликоля при одних и тех же концентрациях субстратов, обеспечивающих молярный избыток МЭФГ над 7-АДЦК, равный 2,2. Поскольку в препаратах нативной wt-XrAEN имелась примесь бета-лактамазы (см. ниже), то для чистоты эксперимента в качестве биокатализатора использовали препарат рекомбинантной r-XrAEN, в котором в условиях проведения синтеза такая активность не детектировалась. Условия проведения экспериментов и величины выхода целевого продукта (синтезы 1, 2) представлены в таблице.

Динамика расхода исходных субстратов 7-АДЦК и МЭФГ и накопления цефалексина и ФГ в присутствии и в отсутствие в реакционной среде этиленгликоля представлена на рис. 2, 3 соответственно. Показанное

на оси ординат относительное содержание 7-АДЦК и цефалексина в текущий момент времени (по отношению к содержанию 7-АДЦК в исходной реакционной смеси) рассчитаны исходя из текущих молярных концентраций этих компонентов, определенных методом ВЭЖХ. Следует отметить, что динамика изменения относительной концентрации цефалексина отражает зависимость от времени степени трансформации источника бета-лактаманного ядра 7-АДЦК в целевой продукт, т.е. выхода целевого антибиотика по отношению к наиболее дорогому субстрату. Кривые накопления ФГ отражают общую скорость побочных процессов гидролиза исходного МЭФГ и целевого продукта цефалексина.

Из данных рис. 2 и таблицы (синтез 1) видно, что при проведении процесса синтеза в водной среде максимальная степень трансформации 7-АДЦК в цефалексин достигается уже через 40 мин и составляет около 70%, и это значение затем сохраняется в течение 20 мин. Добавление в среду этиленгликоля приводит к тому, что максимальный выход цефалексина по отношению к 7-АДЦК составляет почти 95% (рис. 3 и таблица, синтез 2). Сравнение кривых накопления побочного продукта ФГ (рис. 2, 3) показывает, что увеличение выхода цефалексина в водно-органической среде достигается за счет замедления скорости гидролитических процессов. Из данных, приведенных на рис. 2, 3, следует, что начальная скорость накопления ФГ в водно-органической смеси примерно в 4 раза меньше, чем в водном растворе. В результате в реакционной среде, содержащей этиленгликоль, благодаря снижению скорости гидролиза МЭФГ текущий молярный избыток ацилирующего агента по отноше-

**Ферментативный синтез цефалексина, катализируемый препаратами XrAEN из различных штаммов-продуцентов\***

Номер синтеза	Фермент	Особенности проведения процесса		$\tau_{\text{макс}}$ , мин	Максимальный выход цефалексина, %	Молярный избыток [МЭФГ]/[7-АДЦК] в момент $\tau_{\text{макс}}$	Баланс в момент $\tau_{\text{макс}}$ , %	
		активность фермента в реакционной смеси**, МЕ/мл	$C_{ЭГ}$ , об.%				по $\beta$ -лактаманному ядру	по ФГ
1	r-XrAEN	5,3	0	40–60 (45)	69,7	0,9	97–104	95–104
2	r-XrAEN	4,7	33	45–75 (60)	94,7	4,2	99–105	95–104
3	wt-XrAEN	4,7	33	45–75 (60)	85,1	5,6	89–95	95–102

\*Общие условия: объем смеси 30 мл; температура 30°C; исходный pH среды 6,2; начало автоматического титрования реакционной смеси раствором NaOH при pH 6,0; исходная концентрация 7-АДЦК и МЭФГ соответственно 103 и 225 мМ (молярный избыток [МЭФГ]/[7-АДЦК] = 2,2).  $\tau_{\text{макс}}$  – время достижения максимального выхода цефалексина, мин (временной диапазон плато, в скобках приведено значение точки максимума);

\*\*рассчитана из начальной скорости реакции.

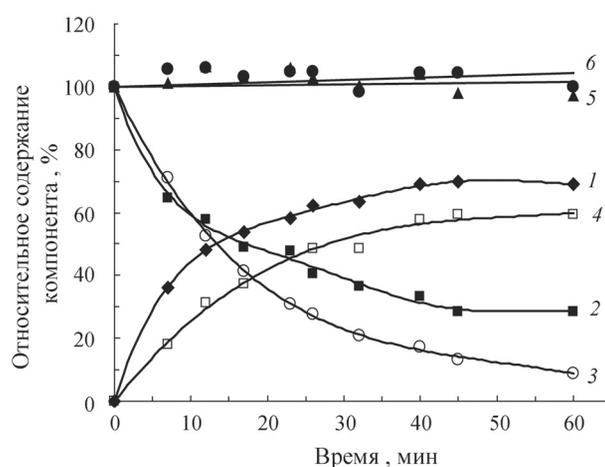


Рис. 2. Динамика изменения состава реакционной смеси при ферментативном синтезе цефалексина в водной среде, катализируемом рекомбинантной  $\gamma$ -ХгАЕН из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-11246. Условия синтеза см. в разделе Материалы и методы и в таблице. Условные обозначения: 1 – ЦЕЛ; 2 – 7-АДЦК; 3 – МЭФГ; 4 – ФГ; 5 – баланс по бета-лактаму; 6 – баланс по фенильному радикалу

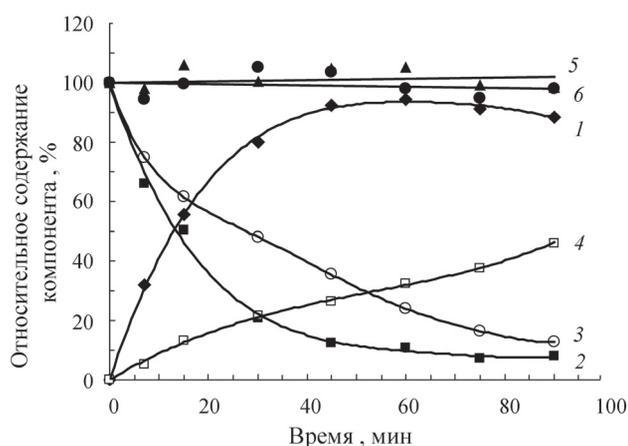


Рис. 3. Динамика изменения состава реакционной смеси при ферментативном синтезе цефалексина в водно-органической среде (33 об.% этиленгликоля), катализируемом рекомбинантной  $\gamma$ -ХгАЕН из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-11246 (1 – ЦЕЛ; 2 – 7-АДЦК; 3 – МЭФГ; 4 – ФГ; 5 – баланс по бета-лактаму; 6 – баланс по фенильному радикалу). Условия синтеза см. в разделе Материалы и методы и в таблице

нию к 7-АДЦК по ходу процесса возрастает, что способствует сдвигу равновесия в системе в сторону синтеза антибиотика и ускорению целевой реакции. Из таблицы видно, что в опыте 2 к моменту достижения максимального выхода цефалексина (60 мин) текущий молярный избыток  $[MЭФГ]/[7-АДЦК]$  составляет 4,2, что почти в два раза превышает этот показатель для исходной реакционной смеси. В водной среде (таблица, синтез 1), напротив, по ходу процесса молярный избы-

ток  $[MЭФГ]/[7-АДЦК]$  снижается и к моменту достижения максимального выхода цефалексина (40 мин) оказывается меньше 1, что тормозит синтез. Время достижения максимального значения выхода целевого продукта при добавлении в раствор этиленгликоля немного возрастает по сравнению с процессом в водном растворе.

Следует отметить, что при использовании в качестве биокатализаторов препаратов рекомбинантной  $\gamma$ -ХгАЕН как в водной, так и в водно-органической среде (рис. 2 и 3; таблица, синтезы 1 и 2) в течение всего процесса синтеза цефалексина в пределах ошибки эксперимента наблюдается практически стопроцентный баланс как по компонентам, содержащим бета-лактамно ядро, так и по соединениям, несущим фенильный остаток. Этот факт свидетельствует о том, что в ходе синтеза не протекают неконтролируемые побочные процессы, в том числе связанные с разрушением бета-лактамно ядра под действием бета-лактамаз.

Далее в условиях, обеспечивших лучший результат (таблица, синтез 2), был проведен синтез цефалексина с использованием в качестве биокатализатора нативной  $wt$ -ХгАЕН из мутантного штамма *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915. Результаты эксперимента представлены на рис. 4 и в таблице (синтез 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что замена рекомбинантной  $\gamma$ -ХгАЕН на  $wt$ -ХгАЕН приводит к ухудшению эффективности процесса синтеза. При сохранении скорости процесса синтеза в начальный момент максимальный достигаемый выход цефалексина снижается с 94,7 до 85,1%. Кроме того, в случае применения нативной  $wt$ -ХгАЕН в ходе процесса наблюдается нарушение материального баланса (снижение общего количества 7-АДЦК и цефалексина на 15% за 120 мин процесса), что свидетельствует о наличии в препарате нативного фермента бета-лактамазной активности.

На рис. 5 сопоставлены кривые накопления цефалексина в реакционной смеси в синтезах 1–3, отражающие динамику накопления целевого антибиотика в зависимости от типа реакционной смеси и используемого препарата ХгАЕН. Представленные данные позволяют сделать вывод о том, что использование водно-органической среды оказывает большой положительный эффект на общий выход целевого продукта (таблица, синтезы 1 и 2). Кроме того, результаты наших экспериментов наглядно указывают на существенное преимущество рекомбинантной  $\gamma$ -ХгАЕН из штамма *E. coli* ВКПМ В-11246 по сравнению с нативной  $wt$ -ХгАЕН из исходного мутантного штамма *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 при проведении синтеза цефалексина в одинаковых условиях (таблица, синтезы 2 и 3 соответственно). При одинаковой начальной

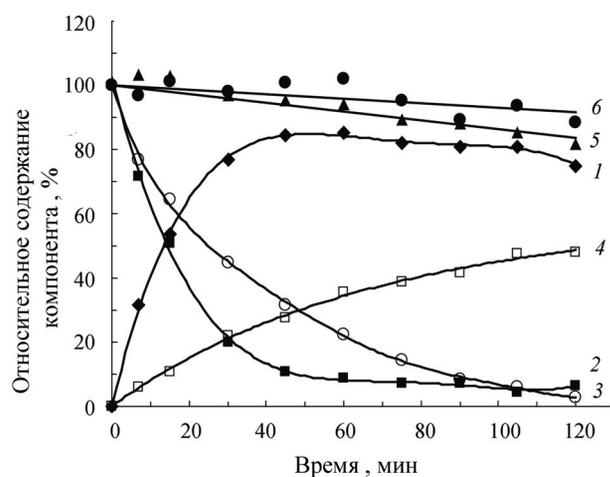


Рис. 4. Динамика изменения состава реакционной смеси при ферментативном синтезе цефалексина в водно-органической среде (33 об % этиленгликоля), катализируемом нативной wt-XrAEN из мутантного штамма *X. rubrilineans* ВКПМ В-9915 (1 – ЦЕЛ; 2 – 7-АДЦК; 3 – МЭФГ; 4 – ФГ; 5 – баланс по бета-лактаму; 6 – баланс по фенильному радикалу). Условия синтеза см. в разделе Материалы и методы и в таблице

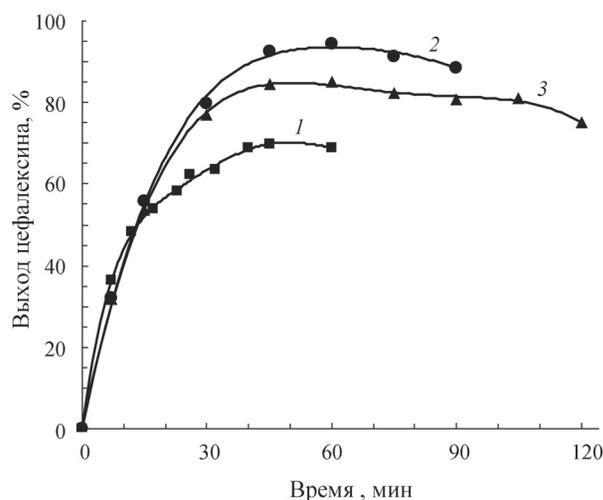


Рис. 5. Влияние типа препарата АЕН и присутствия этиленгликоля в реакционной среде на динамику выхода цефалексина из 7-АДЦК (1, 2 – рекомбинантная r-XrAEN из *E. coli* ВКПМ В-11246 в водной среде и в присутствии 33 об.% этиленгликоля соответственно; 3 – нативная wt-XrAEN из *X. rubrilineans* ВКПМ В-9915, 33 об.% этиленгликоля). Условия синтеза см. в разделе Материалы и методы и в таблице

скорости процесса и использовании r-XrAEN максимальный достигаемый выход цефалексина больше на 10% по сравнению с таковым для wt-XrAEN. Кроме того, отсутствие в препаратах r-XrAEN примеси бета-лактамаз, разрушающих бета-лактамноядро 7-АДЦК и целевого продукта, приводит к отсутствию в синтезируемом цефалексине примесей продуктов неспецифического разрушения бета-лактамного цикла. Этот факт позволяет существенно снизить стоимость выделения и очистки цефалексина из реакционной смеси. Мы также запланировали эксперименты по разработке процессов синтеза других пенициллиновых и цефалоспориновых антибиотиков

с помощью рекомбинантной r-XrAEN. Однако для этого необходимы не только оптимизация условий проведения процесса, но и проведение специальных генно-инженерных исследований для направленного изменения свойств как самого фермента, так и рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента r-XrAEN. Для улучшения каталитической активности и стабильности нами было выполнено компьютерное моделирование структуры как свободного фермента, так и его комплексов с рядом субстратов и антибиотиков [17]. Наличие таких структур позволяет использовать высокоэффективный подход рационального дизайна для белковой инженерии r-XrAEN.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (госконтракт 14.512.11.0066) и РФФИ (проект № 11-04-00962-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmidt F.-R. // Hofrichter M. (Ed) Industrial applications. The Mycota X. Chapter 5. Berlin, Heidelberg. 2010. P. 101.
- Volpato G., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // Curr. Med. Chem. 2010. **17**. P. 3855.
- Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. // Flickinger M.C. (Ed) Encyclopedia of Industrial Biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. 2010. P. 1.
- Sklyarenko A.V., Kurochkina V.B., Egorov A.M. Enzymatic transformation and synthesis of beta-lactam antibiotics. // In: Egorov A.M. & Zaikov G. (Eds): New research on biotechnology in biology and medicine. - Nova Science Publishers. 2006. - Chapter 8. P. 73.
- Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. Enzymatic synthesis of beta-lactam antibiotics. // In: Zaikov G.E. (Ed) Biotechnology state of the art and prospects for development. Nova Science Publishers. – 2008. Chapter 20. P. 175-204.
- Bruggink A. (Ed). Synthesis of beta-lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis and process integration. // Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2001. 340 pp.
- Курочкина В.Б., Скляренко А.В., Березина О.В., Яроцкий С.В. // Биотехнология. 2012. № 5. P. 8.
- Kurochkina V. B., Sklyarenko A.V., Berezina O.V., and Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. **49**. P. 1.
- Barends T.R.M., Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., Williams C., Wybenga G., Janssen D.B., Dijkstra B.W. // J. Biol. Chem. 2006. **281**. P. 5804.
- Blum J.K., Bommarius A.S. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. **67**. P. 21.
- Polderman-Tijmes, J.J., Jekel P.A., de Vries E.J., van Merode A.E.J., Floris R., van der Laan J.-M., Sonke T., Janssen D.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. **68**. P. 211.
- van der Laan, J.-M., Polderman-Tijmes, J.J., Barends, T.R.M.

- Recombinant alpha-amino ester hydrolases and uses thereof // Int. Patent WO02086111. 2002.
13. Zarubina S.A., Fedorchuk E.A., Fedorchuk V.V., Berezina O.V., Sklyarenko A.V., Savin S.S., Yarotsky S.V., Uporov I.V., Tishkov V.I. // FEBS Journal. 2013. 280. N S1. P. 79.
14. Бerezina O.B., Sklyarenko A.B., Abesheva Z.A., Satarova D.E., Яроцкий С.В., Тишков В.И., Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Савин С.С. // Патент RU2499830. Бюл. Изобретения. Полезные модели. 2013. № 33.
15. Складенко А.В., Курочкина В.Б., Сатарова Д.Э., Крестьянова И.Н., Ксионг Х., Джсианг Й., Ху Ю., Ванг М. / Патент RU2381273. // Бюл. Изобретения. Полезные модели. 2010. № 4.
16. Sapan C.V., Lundblad R.L., Price C. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1999. 29. P. 99.
17. Zarubina S.A., Uporov I.V., Fedorchuk E.A., Fedorchuk V.V., Sklyarenko A.V., Yarotsky S.V., Tishkov V.I. // Acta Naturae. 2013. 5. N 4(19). P. 76.

Поступила в редакцию 20.12.13

## RECOMBINANT ALPHA-AMINO ESTER HYDROLASE FROM *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 IS HIGHLY EFFICIENT BIOCATALYST OF CEPHALEXIN SYNTHESIS

A.V. Sklyarenko<sup>2</sup>, O.V. Berezina<sup>2</sup>, D.E. Satarova<sup>2</sup>, V.V. Fedorchuk<sup>1,3</sup>, E.A. Fedorchuk<sup>1,3</sup>, S.S. Savin<sup>3,4</sup>, S.V. Yarotsky<sup>2</sup>, V.I. Tishkov<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia, <sup>2</sup>State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNI-Igenetika), <sup>3</sup>Innovations and High Technologies MSU Ltd., Moscow, Russia, <sup>4</sup>A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; e-mail: vitishkov@gmail.com

Recombinant as well as native alpha-amino ester hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915 (XrAЕН, КФ 3.1.1.43) was tested for synthesis of amino-beta-lactam antibiotic cephalixin. It was shown that recombinant enzyme r-XrAЕН produced by *Escherichia coli* ВКПМ В-11246 is more efficient compared to native one, wt-XrAЕН prepared from mutant strain *Xanthomonas rubrilineans* ВКПМ В-9915. Addition of ethylene glycol to reaction mixture (33 v/v%) results in increase of maximum yield of cephalosporin from 75 to 95% using as biocatalyst r-XrAЕН. At optimal synthesis conditions change of r-XrAЕН with wt-XrAЕН results in decrease of cephalosporin maximum yield from 95 to 85%. This effect is caused by presence of beta-lactamase side activity in wt-XrAЕН preparation.

**Key words:** alpha-amino ester hydrolase, recombinant enzyme, cephalixin, synthesis.

**Сведения об авторах:** Складенко Анна Владимировна – вед. науч. сотр. лаборатории технологического развития ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), канд. хим. наук; Бerezina Оксана Валентиновна – ст. науч. сотр. лаборатории технологического развития ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), канд. биол. наук; Сатарова Дженни Эрнстовна – ст. науч. сотр. лаборатории технологического развития ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), канд. хим. наук; Федорчук Владимир Витальевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Федорчук Елена Александровна – вед. инженер кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук; Яроцкий Сергей Викторович – зав. лабораторией технологического развития, зам. директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика); канд. хим. наук, доцент; Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук.